

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

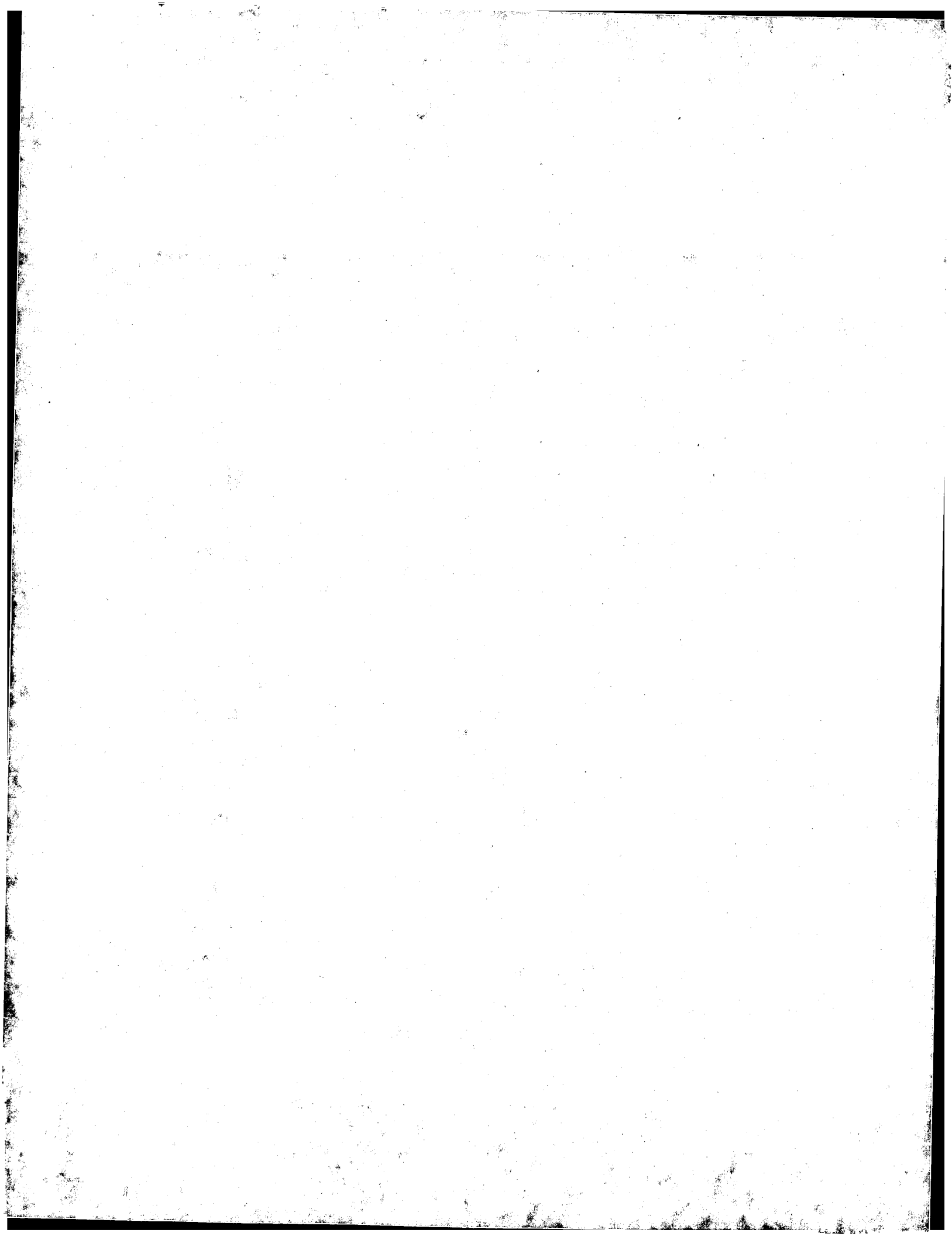
Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : A61K 39/395, C12N 5/06, 5/08	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/39034 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 11. September 1998 (11.09.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/01089 (22) Internationales Anmeldedatum: 26. Februar 1998 (26.02.98) (30) Prioritätsdaten: 197 08 713.2 4. März 1997 (04.03.97) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH [DE/DE]; D-55216 Ingelheim (DE). FORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE GMBH [DE/DE]; Weberstrasse 5, D-76133 Karlsruhe (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HERRLICH, Peter [DE/DE]; Im Vogelsang 8, D-76229 Karlsruhe (DE). PONTA, Helmut [DE/DE]; Schillerstrasse 76, D-76356 Weingarten (DE). SIMON, Jan [DE/DE]; Becherwaldstrasse 27a, D-79249 Merzhausen (DE). WEISS, Johannes [DE/DE]; Schillerstrasse 5a, D-79183 Waldkirch (DE). (74) Anwalt: LAUDIEN, Dieter; Boehringer Ingelheim GmbH, A Patente, Postfach 200, D-55216 Ingelheim (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, MX, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>

(54) Title: USE OF PREPARATIONS CONTAINING ANTI-CD44 ANTIBODIES IN THE TREATMENT OF CERTAIN TUMOURS AND THE SUPPRESSION OF IMMUNE REACTIONS

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON ANTI-CD44 ANTIKÖRPER ENTHALTENDEN PRÄPARATIONEN ZUR BEHANDLUNG BESTIMMTER TUMORE UND ZUR UNTERDRÜCKUNG VON IMMUNREAKTIONEN

(57) Abstract

The present invention relates to the use of anti-CD44 antibodies from the constant portion (sCD44) and variable portion of CD44 (vCD44) in the treatment of certain tumours and other diseases which are associated with degeneracy and activation of Langerhans cells (LC) and dendritic cells (DC) in the body of a mammal including human beings, and in the treatment of undesirable immune reactions. The invention also relates to an *ex vivo* culture method for the production of dendritic cells.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von anti-CD44 Antikörpern von sowohl des konstanten (sCD44) als auch des variablen Teils von CD44 (vCD44) für die Behandlung bestimmter Tumore und anderen Erkrankungen, die mit einer Entartung und Aktivierung von Langerhans-Zellen (LC) und dendritischen Zellen (DC) innerhalb eines Säugetierkörpers einschließlich des Menschen assoziiert sind, und zur Behandlung unerwünschter Immunreaktionen. Ein weiter Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft ein *ex vivo* Kulturverfahren zur Herstellung von dendritischen Zellen.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verwendung von anti-CD44 Antikörper enthaltenden Präparationen zur Behandlung bestimmter Tumore und zur Unterdrückung von Immunreaktionen

5

Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von anti-CD44 Antikörpern gegen sowohl den konstanten als auch den variablen Teil von CD44 für die Behandlung bestimmter Tumore und anderen Erkrankungen, die mit einer Entartung und Aktivierung von Langerhans-Zellen (LC) und dendritischen Zellen (DC) innerhalb eines Säugetierkörpers einschließlich des Menschen assoziiert sind, und zur Behandlung unerwünschter Immunreaktionen. Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft ein ex vivo Kulturverfahren zur Herstellung von dendritischen Zellen.

10

Epidermale Langerhans-Zellen (LC) gehören zur Familie der dendritischen Zellen (DC) des Blutes, die ein wesentlicher Bestandteil des peripheren Immunsystems sind (Simon, J.C. et al., *Hautarzt* 43:241-249, 1992). Durch ihre exponierte Lage in der Haut oder anderen peripheren Organen bilden sie die "Wachposten des Immunsystems" (Simon, J.C. et al., 1992, *loc. cit.*). Sie gehören zu den potentesten Immunzellen des Säugetiers bzw. des menschlichen Organismus und haben als einzige die Fähigkeit, primäre T-Zell-vermittelte Immunreaktionen einzuleiten. Beispiele für solche Immunreaktionen sind Allergien vom verzögerten Typ, Transplantationsabstoßungen, sowie gegen Viren oder Tumoren gerichtete Immunantworten (Grabbe, S. et al., *Immunology Today* 16:117-121, 1995; Moll, H., The immunefunctions of epidermal Langerhans cells, Heidelberg: Springer Verlag, 1995; Steinmann, R.M. et al., *Adv. Exp. Med. Biol.* 329:1-9-, 1993; Schuler, G. et al., *Adv. Exp. Med. Biol.* 329: 243-249, 1993).

20

25

Voraussetzung für diese Immunfunktion der LC/DC ist ihre Wanderung von der Haut oder von anderen Organen in die peripheren Lymphknoten (Romani, N. et al., *J. Exp. Med.* 180:83-93, 1994; Kripke, M. L. et al., *J. Immunol.* 145:2833-2838, 1990; Cumberbatch, M. et al., *Immunology* 81:395-401, 1994). Dort haften sie in distinkten anatomischen Regionen an, den sogenannten parakortikalen T-Zell-Arealen, wo sie Antigen-spezifische ruhende "naive" T-Lymphozyten aktivieren. Die Mechanismen, welche diese gerichtete Wanderung und Anheftung blockieren sind nicht bekannt.

30

Wegen ihrer außergewöhnlichen Fähigkeit, Immunantworten einzuleiten, werden außerhalb des Körpers hergestellte dendritische Zellen seit kurzem auch als Immuntherapeutika, zum Beispiel bei bestimmten Tumoren, eingesetzt (Grabbe, S. et al., 1995, *loc. cit.*). Jedoch erreichen die durch die bekannten Verfahren hergestellten DC nur selten die peripheren Lymphknoten, in denen sie eine Immunantwort auslösen können, sodaß die nach dem Stand der Technik ex vivo hergestellten DC nicht in dem gewünschten Maße als Immuntherapeutika wirksam sind.

35

Das Oberflächen Glykoprotein CD44 ist von zentraler Bedeutung für die Wanderung von aktivierten Immunzellen und bestimmten Tumorzellen in die peripheren Lymphknoten (Zahalka, M.A. et al., *J. Immunol.* 154:5345-5355, 1995; Jalkanen, S. et al., *J. Cell. Biol.* 105:983-990, 1987; Seiter, S. et al., *J. Exp. Med.* 177:443-455, 1993; Thomas, L. et al., *J. Invest. Dermatol.* 100:115-200, 1993; Thomas, L. et al., *J. Cell. Biol.* 118:971-977, 1992). Ob CD44 und/oder dessen Isoformen für die Wanderung von LC und DC und ihre Anheftung an Lymphknoten sowie ihre Immunfunktion eine Rolle spielen, ist unbekannt.

Die DNA- und Aminosäuresequenz von der konstanten Form bzw. Standardform von CD44 des Menschen und verschiedener Tiere sind beschrieben, beispielsweise in Tölg, C. et al., *Nucl. Acids Res.* 21:1225-1229, 1993; Screatton, G. R. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:12160-12164, 1992; Stamenkovic, I. et al., *The EMBO Journal* 10:343-348, 1991; Günthert, U. et al., *Cell* 65:13-24, 1991; Stamenkovic, I. et al., *Cell* 56:1057-1062, 1991).

Bei CD44 handelt es sich um ein auf der Zelloberfläche lokalisiertes Glykoprotein, welches ursprünglich als "lymphocyte homing receptor" beschrieben wurde (Screatton, G. R. et al., 1992, *loc. cit.*). Es soll bei der Adhäsion von Lymphocyten an bestimmten mucösen Endothelzellen von Venen (Peyer's patch oder Peyer-Plaques bzw. Folliculi lymphatici aggregati) bzw. postkapillaren Venen der Lymphknoten beteiligt sein (Jalkanen S. T. et al., *Eur. J. Immunol.* 16:1195-1202, 1986; Camp, R. L. et al., *J. Exp. Med.* 173:763-766, 1991). Darüber hinaus wird dem CD44 Glykoprotein eine Beteiligung bei der Reifung und Aktivierung von Lymphocyten zugeschrieben bzw. einen die erhöhte Migrationsfähigkeit aller Lymphoblasten (mit-)bedingenden Effekt (z.B. Camp, R. L. et al., 1991, *loc. cit.*; Huet, S. et al., *J. Immunol.* 143:798-801, 1989) und soll eine Rolle als Ankerstelle für andere Adhäsionsmoleküle spielen (Shimizu, Y. et al., *J. Immunol.* 143:2457-2463, 1989). Bis heute sind jedoch nicht alle diese Funktionen von CD44 eindeutig geklärt.

Es konnte bei Ratten-Tumorzellen, die über das lymphatische System metastasieren (BSp73-Zellen eines spontanen Ratten Pankreas-Adenokarzinoms), festgestellt werden, daß diese Zellen Varianten von CD44 (vCD44) exprimieren und für die Verbreitung ("trafficking") von Tumorzellen verantwortlich sind. An anderen Tumorzelllinien konnten ebenfalls diese Verhältnisse nachgewiesen werden.

Es konnte ferner gezeigt werden, daß dieses vCD44 Glykoprotein einen *a priori* nicht metastasierenden Tumor Metastasefähigkeiten verleiht, während die Standardform von CD44 (sCD44) dazu nicht in der Lage ist. Somit kann heute davon ausgegangen werden, daß vCD44 gegenüber sCD44 ein metastasespezifisches Protein ist, welches Tumoren die Fähigkeit verleiht, über die Lymphbahnen zu metastasieren (Günthert, U. et al., 1991, *loc. cit.*).

Die weitere Aufklärung des vCD44 Glykoproteins der Ratte bis hin zur endgültigen Charakterisierung der DNA- und Aminosäuresequenz gelang Günthert, U. et al., 1991, *loc. cit.*, anhand des BSp73-Rattenzellsystems, welches aus zwei morphologisch bzw. phenotypisch verschiedenen syngenischen Zellvarianten besteht: einer nichtmetastasierenden Variante AS (BSp73AS) und einer metastasierenden Variante ASML (BSp73ASML) (Matzku, S. et al., *Cancer Research* 49:1294-1299, 1989).

Zu diesem Zweck wurden monoklonale Antikörper (mAbs) hergestellt, die die antigene Determinante auf der metastasierenden Variante BSp73ASML erkennen.

Sowohl aus dem Primärtumor (subcutaner nicht-metastasierender Knoten bestehend aus BSp73AS-Zellen) als auch einer Metastase davon (BSp73ASML-Zellen, welche in Lymphknoten und Lunge metastasieren) wurden Zelllinien gewonnen. Es wurden mAbs hergestellt, die gegen die Membranproteine von BSp73ASML-Zellen gerichtet sind (Matzku, S. et al., 1989, *loc. cit.*). Einer von diesen mAbs, der nur Epitope auf BSp73ASML-, nicht jedoch solche auf BSp73AS-Zellen oder anderen nicht-tumorigenen Zellen erkennt, wurde dazu benutzt, um eine *E. coli* cDNA-Expressionsbibliothek, hergestellt aus poly(A)⁺RNA von BSp73ASML-Zellen und einem geeigneten Vektorsystem, zu durchsuchen. Auf diesem Weg konnte ein Klon identifiziert werden (pMeta-1) der die vollständige cDNA mit einer Länge von 3207 bp enthält und welche für eine zusätzliche Domäne von 162 Aminosäuren codiert. Diese Domäne ist weder in sCD44-Zellen noch in anderen nicht-metastasierenden Tumorzellen zu finden und enthält die mAb spezifische Epitop-codierende Region. Anhand von mRNA Präparationen aus Zellen verschiedener Geweben und damit durchgeführter mRNA:DNA Hybridisierungen mit unterschiedlichen von den cDNA Klonen erhaltenen DNA Proben war festzustellen, daß vCD44 eine Spleiß-Variante von sCD44 darstellt und daß die Expression der vCD44 RNAs mit der Entstehung von Metastasen einhergeht. Damit steht fest, daß die durch die 486 bp lange Insertion codierte zusätzliche extrazelluläre Domäne (Aminosäuren 224 bis 385 in pMeta-1) der metastasenrelevante Anteil des Oberflächenglykoproteins vCD44 ist (Matzku, S. et al., 1989, *loc. cit.*).

Das metastatische Tumorwachstum (Adenokarzinom der Ratte) konnte nach Immunisierung mit monoklonalen Antikörpern, die das vorgenannte Epitop erkennen bzw. die spezifisch mit diesen extrazellulären Bereich von vCD44 reagieren, unterdrückt werden (Reber, S. et al., *Int. J. Cancer* 46:919-927, 1990).

Die Identifizierung dieser varianten extrazellulären Domäne in der Ratte (pMeta-1 bzw. rMeta-1) ermöglichte, auch die dazu äquivalenten menschlichen Nukleotid- und Aminosäure-Sequenzen aufzuklären:

Es wurde kürzlich gezeigt, daß die Expression von Varianten des Oberflächen-Glykoproteins CD44 notwendig und hinreichend ist, um sogenanntes spontanes metastatisches Verhalten sowohl in einer nicht-metastasierenden Pankreas-Adenokarzinom-Zelllinie der Ratte als auch in einer nicht-metastasierenden Fibrosarkom-Zelllinie der Ratte auszulösen (Günthert, U. et al., 1991, *loc. cit.*). Während die kleinste CD44-Isoform, die Standardform sCD44, in einer Reihe verschiedener Gewebe, darunter Epithelzellen, ubiquitär exprimiert wird, werden bestimmte Spleißvarianten von CD44 (vCD44) nur auf einer Untergruppe von Epithelzellen exprimiert. Die CD44-Isoformen werden durch alternatives Spleißen so erzeugt, daß die Sequenzen von 10 Exons (v1-v10) in sCD44 komplett ausgeschnitten werden, jedoch bei den größeren Varianten in verschiedenen Kombinationen vorkommen können (Screaton, G. R. et al., 1992, *loc. cit.*; Heider, K.-H. et al., *J. Cell. Biol.* 120:227-233, 1993; Hofmann, M. et al., *Cancer Res.* 51:5292-5297, 1991). Die Varianten unterscheiden sich dadurch, daß an einer bestimmten Stelle des extrazellulären Teils des Proteins unterschiedliche Aminosäuresequenzen inseriert sind. Solche Varianten konnten in verschiedenen menschlichen Tumorzellen und in menschlichem Tumorgewebe nachgewiesen werden. So wurde kürzlich die Expression von CD44-Varianten im Verlauf der kolorektalen Karzinogenese untersucht (Heider, K.-H. et al., 1993, *loc. cit.*). Die Expression von CD44-Varianten fehlt in normalem menschlichem Gewebe (z.B. Kolonepithel), und nur eine schwache Expression ist in den proliferierenden Zellen der Krypten nachweisbar. In späteren Stadien der Tumorprogression, z.B. in Adenokarzinomen, exprimieren alle malignen Entartungen Varianten von CD44. Weiter wurde kürzlich die Expression von CD44-Spleißvarianten in aktivierten Lymphozyten sowie in Non-Hodgkin-Lymphomen gezeigt (Koopman, G. et al., *J. Exp. Med.* 177:897-904, 1993).

In der Publikation von Tölg, C. et al., *Nucleic Acids Res.* 21(5):1225-1229, 1993, wird beschrieben, daß CD44 in verschiedenen Isoformen vorkommt. Die Aminosäuresequenzen von zehn verschiedenen Exons v1 bis v10 der Maus, Ratte und des Menschen werden offenbart:

Die Aminosäure-Sequenz von Exon v4 von human vCD44 lautet (Einbuchstaben-Code):

ISTTPRAFDHTKQNQDWTQWNPSHSNPEVLLQTTTRMT

Die Aminosäure-Sequenz von Exon v5 von human vCD44 lautet (Einbuchstaben-Code):

DVDRNGTTAYEGNWNPEAHPPLIHHEHHEEEETPHSTST

Die Aminosäure-Sequenz von Exon v6 von human vCD44 lautet (Einbuchstaben-Code):

QATPSSTTEETATQKEQWFGNRWHEGYRQTPREDSSHSTTGTA

Die Aminosäure-Sequenz von Exon v9 von human vCD44 lautet (Einbuchstaben-Code):

QQSNSQSFSTSHGLEEDKDHPTTSTLTSS

5

Die WO 91/17248 beschreibt die Verwendung von anti-vCD44 Antikörper für die Therapie und Diagnostik von Tumoren. Die WO 95/00851 betrifft die Verwendung von gegen variante Exons von CD44 gerichtete Antikörper für die Diagnose und Analyse von Tumoren. In der WO 95/04547 wird die Verwendung von solchen Antikörpern für immuntherapeutische und immunszintigraphische Zwecke beschrieben, die insbesondere gegen das variante Exon v5 gerichtet sind. Die WO 95/33771 beschreibt Antikörper gegen variantes Exon v6 von CD44. In der EP-A 0 538 754 wird die Verwendung von gegen variantes CD44 (vCD44) gerichtete Antikörper für die Immunsuppression beschrieben.

15 Aufgabe der vorliegenden Erfindung war die Bereitstellung von Mitteln zu Behandlung bestimmter Tumore und zur Unterdrückung von Immunantworten und die Entwicklung von Verfahren zur Herstellung solcher Mittel.

Die Aufgabe konnte mit der vorliegenden Erfindung im Rahmen der Beschreibung und der Patentansprüche gelöst werden, indem einerseits Antikörper gegen den konstanten Teil von CD44 (Standardform, sCD44) und/oder gegen die varianten Formen von CD44 (vCD44) verwendet werden, um maligne Erkrankungen, die mit einer Entartung und Aktivierung von Langerhans Zellen (LC) und/oder dendritischen Zellen (DC) assoziiert sind, zu therapieren und in dem andererseits Antikörper gegen den konstanten Teil von CD44 (sCD44) verwendet werden, um unerwünschte oder überschießende Immunreaktionen zu unterdrücken und dadurch bedingte Erkrankungen und Ereignisse zu therapieren bzw. positiv zu beeinflussen.

30 In einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung werden nach bestimmten Verfahren hergestellte dendritische Zellen (DC) dazu verwendet, in vivo Immunreaktionen auszulösen oder einzuleiten, um beispielsweise eine adoptive Immuntherapie durchzuführen.

In diesem Zusammenhang wird auch ein ex vivo Kultivierverfahren zur Herstellung dendritischer Zellen, die vorzugsweise in periphere Lymphknoten einwandern, von der vorliegenden Erfindung umfaßt.

35 Mit einem solchen Kultivierungsverfahren wird auch die Aufgabe gelöst, dendritische Zellen mit der Fähigkeit auszustatten, gezielt in die peripheren Lymphknoten einzuwandern, dort in den T-Zell-Arealen zu haften und eine T-Zell-vermittelte Immunreaktion einzuleiten. Dies hat große Bedeutung für die Verwendung solcher dendritischer Zellen für immuntherapeutische Zwecke.

Als bevorzugte Antikörper kommen für die genannten, erfindungsgemäßen Verwendungen solche in Betracht, die mit Epitopen des N-terminalen Anteils des konstanten Teils von CD44 (sCD44) reagieren oder die Epitope, die durch die varianten Exons v4, v5, v6 oder v9 kodiert werden, erkennen, wovon Antikörper gegen v6 ganz bevorzugt sind. Unter N-terminalem Anteil des konstanten Teils von CD44 sollen der Anteil des Proteins verstanden werden, der durch die konstanten Exons 1 bis 5 des CD44-Gens gemäß der Publikation von Screatton et al. (Screatton G R et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 12160-12164, 1992) kodiert wird. Insbesondere sind Antikörper bevorzugt, die spezifisch an ein Epitop binden, das durch Exon 2, 3, 4 und/oder 5 kodiert wird.

Beispielsweise kommen die monoklonalen Antikörper BU-52 (The Binding Site, Birmingham, England, Cat.No. MC114; Messadi, D. V and Bertolami, C. N., *Am J. Pathol.* 142:1041-1049, 1993; Spring, F. A. et al., In: *Leucocyte typing V, white cell differentiation antigens*, Schlossman, S.F., Boumsell, L., Gilks, W., Harlan, J. M., Kishimoto, T., Morimoto C., Ritz, J. and Shaw, S. (Ed.), Oxford, New York, Tokyo:Oxford University Press, 1995), SFF-2 (Boehringer Ingelheim Bioproducts, Cat.No. BMS113) oder MEM-85 (Boehringer Ingelheim Bioproducts, Cat.No. BMS5033Fl.01; Bazil, V. et al., *Folia Biologica* 35(5):289-297, 1989; Spring, F. A. et al., In: *Leucocyte typing V, white cell differentiation antigens*, Schlossman, S.F., Boumsell, L., Gilks, W., Harlan, J. M., Kishimoto, T., Morimoto C., Ritz, J. and Shaw, S. (Ed.), Oxford, New York, Tokyo:Oxford University Press, 1995) in Betracht, welche Epitope des N-terminalen Anteils des konstanten Teils von CD44 erkennen.

Ein bevorzugter Antikörper gegen den N-terminalen Anteil des konstanten Teils von CD44 (sCD44) ist der monoklonale Antikörper SFF-2, der von einer Hybridom-Zelllinie sezerniert wird, die am 16.04.1997 unter der Hinterlegungsnummer DSM ACC2305 bei der DSM-Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Deutschland, hinterlegt wurde, oder Derivate dieses Antikörpers.

Ein Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft demzufolge die Verwendung von anti-sCD44 und/oder anti-vDC44 Antikörpern zur Herstellung einer Präparation für die prophylaktische und therapeutische Behandlung von malignen Erkrankungen, die mit einer Entartung, Aktivierung oder massiven Vermehrung von Langerhans Zellen (LC) und/oder dendritischen Zellen (DC) assoziiert sind. Beispielsweise Langerhans-Zell-Histiozytosen, Histiozytose X, Abt-Letterer-Siewe-Syndrom, eosinophiles Granulom (Simon, J.C. et al., *Hautarzt* 43:241-249, 1992).

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung liegt in der erfindungsgemäßen Verwendung von anti-sCD44 Antikörpern, welche N-terminale Epitope von sCD44, oder Teilen davon, erkennen, zur Herstellung einer Präparation für die prophylaktische und therapeutische Be-

handlung von malignen Erkrankungen, die mit einer Entartung, Aktivierung oder massiven Vermehrung von Langerhans Zellen (LC) und/oder dendritischen Zellen (DC) assoziiert sind.

- 5 Ein noch weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung liegt in den oben genannten erfindungsgemäßen Verwendungen von anti-sCD44 Antikörpern, wobei die Antikörper monoklonale Antikörper oder Fragmente oder Derivate davon sind.

- 10 In einem zusätzlichen Aspekt wird von der vorliegenden Erfindung die Verwendung von Antikörpern, die gegen Epitope gerichtet sind, die durch variante Exons von vCD44 oder Teilen davon kodiert werden, zur Herstellung einer Präparation für die prophylaktische und therapeutische Behandlung von malignen Erkrankungen, die mit einer Entartung, Aktivierung oder massiven Vermehrung von Langerhans Zellen (LC) und/oder dendritischen Zellen (DC) assoziiert sind, umfaßt.

- 15 In einer besonderen Ausführungsform umfaßt die vorliegende Erfindung die Verwendung von Antikörpern, die gegen Epitope gerichtet sind, die durch die varianten Exons v4, v5, v6 und/oder v9 oder Teilen davon kodiert werden, zur Herstellung einer Präparation für die prophylaktische und therapeutische Behandlung von malignen Erkrankungen, die mit einer Entartung, Aktivierung oder massiven Vermehrung von Langerhans Zellen (LC) und/oder dendritischen Zellen (DC) assoziiert sind.

Insbesondere werden von der Erfindung die genannte Verwendung von Antikörpern umfaßt, die mit den folgenden Aminosäuresequenzen oder Teilen davon zu reagieren vermögen:

- 25 ISTTPRAFDHTKQNQDWTQWNPSHSNPEVLLLQTTTRMT
DVDRNGTTAYEGNWNPEAHPPLIHHEHHEEEETPHSTST
QATPSSTTEETATQKEQWFGNRWHEGYRQTPREDSHSTTGTA
QQSNSQSFSTSHEGLEEDKDHPTTSTLTSS

- 30 In einer weiteren besonderen Ausführungsform werden für den genannten erfindungsgemäßen Zweck monoklonale Antikörper umfaßt, sowie Fragmente und Derivate davon.

- 35 In einer ganz besonderen Ausführungsform umfaßt die Erfindung die Verwendung des Antikörpers VFF-18, der von einer Hybridom-Zelllinie sezerniert wird, die am 7.6.1994 unter der Hinterlegungsnummer DSM ACC2174 bei der DSM-Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Deutschland, hinterlegt wurde (WO 95/33771), oder Derivate dieses Antikörpers.

Ein zusätzlicher Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung von anti-sCD44 Antikörpern zur Herstellung einer Präparation für die Unterdrückung oder Linderung unerwünschter oder überschießender Immunreaktionen für die Therapie oder Prophylaxe dadurch bedingter Erkrankungen oder um damit verbundene Ereignisse positiv zu beeinflussen.

Demzufolge umfaßt die Verwendung von anti-sCD44 Antikörpern alle diejenigen Erkrankungen und Zustände eines Säugetierorganismus, denen eine immunregulatorische Störung oder eine unerwünschte oder überschießende Immunreaktion zugrundeliegt, wie beispielsweise allergische Erkrankungen, insbesondere Allergien vom verzögerten Typ, Abstoßungen von Haut- oder Organtransplantaten, Autoimmunerkrankungen, Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, Multiple Sklerose, Psoriasis oder atopische Dermatitis.

Für diesen Zweck eignen sich die beschriebenen anti-sCD44 Antikörper sowohl für prophylaktische Maßnahmen als auch für therapeutische Behandlungen.

In einem zusätzlichen Aspekt werden erfindungsgemäß monoklonale anti-sCD44 Antikörper für die oben genannten Verwendungen zur Beeinflussung von Immunreaktionen im Sinne prophylaktischer und therapeutischer Behandlungen umfaßt, wobei die Antikörper monoklonale Antikörper oder Fragmente oder Derivate davon sind.

In einer besonderen Ausführungsform werden für die oben genannten Verwendungen zur Beeinflussung von Immunreaktionen der gegen den durch v6 kodierten Epitop, oder Teilen davon, gerichtete Antikörper VFF-18 und solchen Antikörpern, die mit den von VFF-18 erkannten Epitop oder Teilen davon zu reagieren vermögen, umfaßt.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Herstellung von dendritischen Zellen und deren Verwendung zur Auslösung oder Einleitung einer Immunreaktionen in vivo für die Immuntherapie, insbesondere die adoptive Immuntherapie, beispielsweise die adoptive Immuntherapie von Tumoren oder Viruserkrankungen.

Es wurde gefunden, daß im Verlauf ihrer Wanderung in die Lymphknoten LC und DC ihre Expression von CD44 Isoformen modulieren. Im Einzelnen kommt es zu einer Aufregulierung von Epitopen im N-terminalen konstanten Teil von CD44 sowie von Epitopen, die durch die varianten Exons v4, v5, v6 und v9 kodiert werden. Es wurde ferner gefunden, daß die stadienhafte Modulation von CD44-Isoformen von großer Bedeutung für die Immunfunktion der LC und der DC sind. Erfindungsmäßig wurde nämlich festgestellt, daß die Aktivierung und Auswanderung von LC aus der Epidermis durch Antikörper, insbesondere monoklonale Antikörper, gegen N-terminale Epitope im konstanten Teil von CD44 (sCD44), vollständig verhindert werden kann. Ferner wurde überraschenderweise gefunden, daß die spezifische Anheftung von

LC und DC in den T-Zell-Arealen der peripheren Lymphknoten durch Antikörper, welche Epitope auf varianten Exons, beispielsweise v6 bzw. CD44v6 (zum Beispiel VFF18, offenbart beispielsweise in der WO 95/33771), erkennen, vollständig inhibiert werden kann. Es konnte aber auch festgestellt werden, daß gegen ein N-terminales Epitop im konstanten Teil von CD44 (sCD44) gerichtete Antikörper die Adhäsion ebenfalls blockierte, wenn auch in geringerem Ausmaß gegenüber der Reaktion von Antikörpern gegen variante Exons.

Im Mausmodell konnte bestätigt werden, daß eine systemische Gabe von Antikörpern, insbesondere monoklonalen Antikörpern, gegen variante Epitope von CD44, beispielsweise CD44v6, die Fähigkeit von LC und DC hemmen, eine Allergie gegenüber einem Hapten, beispielsweise 2,4-Dinitrofluorbenzol, auszulösen. Diese Antikörper waren auch wirksam, wenn die Allergie bereits bestand. Überraschenderweise wurde gefunden, daß hier neben den CD44v6-spezifischen monoklonalen Antikörpern auch Antikörper gegen N-terminale Epitope des konstanten Teils von CD44 (sCD44) wirksam waren. Insofern eröffnet sich mit der Verwendung von gegen sCD44 gerichteten Antikörper sowohl eine prophylaktische als auch eine therapeutische Behandlung von Immunprozessen *in vivo*.

In einem entwickelten Zellkulturverfahren konnten DC hergestellt werden, die in periphere Lymphknoten einwandern und dort präferentiell in den T-Zell-Arealen anheften. Das Verfahren beruht erfindungsgemäß darauf, daß Monozyten aus dem peripheren Blut von gesunden Blutspendern oder von Patienten mit malignen Tumoren, beispielsweise Melanomen, oder aus dem Knochenmark, isoliert werden und die daraus gewonnenen Zellen in einem geeigneten Kulturmedium, beispielsweise RPMI 1640, supplementiert mit Serum, Antibiotika, nicht-essentiellen Aminosäuren, einem Puffer, beispielsweise mit einem im Bereich von pH 6.0 und pH 8.5 aktiven Puffer, insbesondere mit einem organischen Puffer, und mindestens einem Cytokin, für einige Tage kultiviert und anschließend isoliert werden.

In einer besonderen Ausführungsform ist das Verfahren dadurch gekennzeichnet, daß die wie oben beschriebenen isolierten Monocyten in einem Kulturmedium, bestehend aus RPMI 1640, fetales Kälberserum, Penicillin/Streptomycin, einem aus einer N-substituierten Aminosulfonsäure, beispielsweise Hepes [4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure] bestehender Puffer, nicht-essentielle Aminosäuren, L-Glutamin, GM-CSF (granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, beschrieben beispielsweise in der WO86/03225 oder von Cantrell, M.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6250-6254, 1985), für einige Tage kultiviert und anschließend isoliert werden.

In einer ganz besonderen, beispielhaften Ausführungsform ist das Verfahren dadurch gekennzeichnet, daß die wie oben beschriebenen isolierten Monocyten in einem Kulturmedium, bestehend aus RPMI 1640, 10% FCS (fetales Kälberserum), 45µg Penicillin/Streptomycin, 25 mM

Hepes, 1 mM nicht-essentielle Aminosäuren, 2 mM L-Glutamin, 50 ng/ml human GM-CSF, vorzugsweise rekombinanter human GM-CSF, und 1000 U/ml Interleukin-4 (IL-4) für 8 Tage kultiviert und anschließend isoliert werden.

- 5 Es konnte überraschenderweise festgestellt werden, daß nach dem erfindungsgemäßen Kultivierungsverfahren die Kultur aus > 90% dendritischen Zellen bestand, welche das gleiche CD44-Isoformmuster aufwiesen wie LC oder DC, die in vivo in Lymphknoten gewandert sind. Die erfindungsgemäß kultivierten DC binden wie aktivierte LC in den parakortikalen T-Zell-
- 10 die varianten Exons v4, v5, v6 oder v9 kodiert werden, beispielsweise durch den monoklonalen Antikörper VFF18, oder die mit Antikörper gegen den konstanten Teil von CD44 (Standardform, sCD44 reagieren, vorzugsweise mit Antikörpern gegen Epitope des N-terminalen Anteils des konstanten Teils von CD44 (sCD44), blockieren.
- 15 Aufgrund dieser ex vivo hergestellten dendritischen Zellen kann in vorteilhafter Weise eine Immuntherapie, insbesondere die adoptive Immuntherapie, beispielsweise die adoptive Immuntherapie von Tumoren oder Viruserkrankungen, in vitro durchgeführt werden. Eine derartige Immuntherapie beruht demzufolge darauf, daß das Wanderungsverhalten der aus dem Blut oder dem Knochenmark erfindungsgemäß hergestellten DC so beeinflusst wird, daß die erfindungsgemäßen dendritischen Zellen in die peripheren Lymphknoten einwandern, wo sie ge-
- 20 wünschte Immunreaktionen einleiten. Mit diesen Zellen kann in vorteilhafter Weise die Immunogenität von DC bei einem Einsatz in der adoptiven Immuntherapie von entzündlichen, infektiösen, proliferativen oder hyperproliferativen Erkrankungen, beispielsweise Virus- oder Tumorerkrankungen optimiert werden.
- 25 Da sowohl die DNA-als auch die Aminosäuresequenzen von sCD44 und von vCD44 bekannt sind, kann der Fachmann somit jedes beliebige variante vCD44 Glykoprotein oder -variante Formen davon (vCD44) tierischer oder menschlicher Herkunft und die sie codierenden Nukleinsäuren (DNAs und RNAs) dazu benutzen, um beliebige gegen sCD44 oder varianten
- 30 Formen davon (vCD44) gerichtete Antikörper, insbesondere monoklonale Antikörper, Fragmente und Derivate davon, für die erfindungsgemäße Verwendung herzustellen und zu benutzen.
- 35 Unter den der vorliegenden Erfindung zugrundeliegenden Begriffen sCD44 oder vCD44 sind Proteine oder Teile bzw. Epitope davon zu verstehen, die durch für sCD44 oder vCD44 codierende RNA, DNA oder Transkripte kodiert werden, einschließlich solche, die durch Mutationen, beispielsweise durch Deletionen, Insertionen, Substitutionen, Inversionen, Transitionen, Transversionen verändert sind und solche, die mit den im Stand der Technik beschriebenen DNA Sequenzen, beispielsweise in Tölg, C. et al., *Nucleic Acids Res.* 21(5):1225-1229, 1993,

oder in Sreaton, G. R. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:12160-12164, 1992, unter den bekannten konventionellen Bedingungen hybridisieren. Dabei ist unerheblich, ob die Herstellung und Isolierung dieser Nukleinsäuren konventionell über Zellkulturen, oder über DNA-Rekombination, über synthetische oder semisynthetische Verfahren erfolgt.

5

Unter den Begriffen sCD44 und vCD44 sind ferner im Rahmen der vorliegenden Erfindung alle jene vom Tier oder vom Menschen abstammenden Glykoproteine zu verstehen, unabhängig von ihrer Herstellung oder Isolierung über konventionelle Zellkulturen oder über DNA Rekombination oder über synthetische oder semisynthetische Verfahren.

10

Unter dem Begriff Antikörper sind mono- oder polyvalente Antikörper und poly- und monoklonale Antikörper zu verstehen, aber auch solche, die Fragmente davon darstellen und Derivate davon, einschließlich der F(ab')₂, Fab' und Fab Fragmente, aber auch chimäre Antikörper oder Hybridantikörper mit mindestens zwei Antigen- bzw. Epitopbindungsstellen, (beispielsweise Quadrome, Triome), Interspecies-Hybridantikörper, anti-idiotypische Antikörper und solche davon, die chemisch modifiziert wurden und als Derivate dieser Antikörper zu verstehen sind und die entweder über die bekannten konventionellen Verfahren der Antikörpergewinnung oder über DNA-Rekombination (beispielsweise Diabody), via Hybridomatechniken oder Antikörper-Engineering oder synthetisch oder semisynthetisch nach an sich bekannter Weise herstellbar sind und an Epitope von sCD44 oder vCD44 zu binden vermögen. Humanisierte Antikörper können beispielsweise durch CDR-grafting (EP 0239400) hergestellt werden. Auch Framework-Regionen können modifiziert werden (EP 0519596; WO 9007861). Zur Humanisierung von Antikörpern können heute Methoden wie PCR (s. z.B. EP 0368684; EP 0438310; WO 9207075) oder Computer-modelling (s. z.B. WO 9222653) angewendet werden. Auf die seit Köhler, G. & Milstein, C., *Nature* 256:495-497, 1975 erschienene, dem Fachmann bekannte, vielfältige Literatur sei hingewiesen.

Hinsichtlich der Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen Epitope von sCD44 und vCD44 stehen eine Anzahl Verfahren zur Verfügung. Es können z.B. für diesen Zweck in an sich bekannter Weise verschiedene Tiere durch Injektion mit sCD44 oder vCD44, welche natürlichen Ursprungs, über DNA-Rekombination oder synthetisch hergestellt sein kann, oder Fragmenten davon, immunisiert werden und aus den danach gewonnenen Seren die gewünschten polyklonalen Antikörper nach bekannten Methoden gewonnen und gereinigt werden. Als Alternative können auch intakte Zellen benutzt werden. Verschiedene Adjuvantien zur Erhöhung der Immunantwort auf die sCD44- oder vCD44-Gabe können, abhängig von dem für die Immunisierung ausgewählten Tier, ebenfalls verwendet werden - beispielsweise Freund's Adjuvant, Mineralgele wie z.B. Aluminiumhydroxid, oberflächenaktive Substanzen wie z.B. Polyanionen, Peptide, Ölemulsionen, Hemocyanine, Dinitrophenol oder Lysolecithin.

Die für die erfindungsgemäße Verwendung bevorzugten monoklonalen Antikörper gegen ein Epitop von sCD44 oder ein Epitop von vCD44 können durch jede beliebige Technik erhalten werden, die für die Herstellung von Antikörpern über Kultivierung von Zelllinien zur Verfügung stehen. Zu derartigen bekannten Techniken zählen z.B. die von Köhler, G. & Milstein, C., 1975, *loc. cit.*, oder Taggart & Samiloff, *Science* 219,:1228-1230, 1983, beschriebenen Verfahren mit Hybridomazellen oder solche mit humanen B Zell Hybridomen (Kozbor et al. *Immunology Today* 4,:72-79, 1983). Chimäre Antikörper gegen sCD44 oder vCD44 oder Teilen davon können beispielsweise aus einer Maus-Antigen-Bindungsdomäne und humanen konstanten Regionen zusammengesetzt sein (Morrison, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81,:6851-6855, 1984; Takeda, et al., *Nature* 314,:452-454, 1985).

Die Antikörper können nach bekannten Methoden gereinigt werden, beispielsweise über Immunoabsorptions- oder Immunoaffinitätschromatographie, über HPLC (High Performance Liquid Chromatography) oder Kombinationen davon. Antikörper Fragmente, welche den Idiotyp des Moleküls enthalten, können gleichermaßen nach bekannten Verfahren hergestellt werden. Beispielsweise können F(ab')₂ Fragmente durch Pepsin Verdauung des vollständigen poly- oder monoklonalen Antikörpers erhalten werden. Fab' Fragmente können erhalten werden, indem beispielsweise die Disulfidbrücken des betreffenden F(ab')₂ Fragments reduziert werden und Fab Fragmente können hergestellt werden beispielsweise durch Behandlung der Antikörpermoleküle mit Papain und einem Reduktionsmittel.

Zur Identifizierung und Selektion von Antikörpern, Fragmenten oder Derivaten davon, die mit einem Epitop von sCD44 oder vCD44 reagieren, kann jedes bekannte Verfahren verwendet werden. Beispielsweise, indem die betreffenden Antikörper nach entsprechender Markierung dedektierbar sind, wenn sie an isoliertes oder gereinigtes sCD44 oder vCD44 oder Teilen davon gebunden haben oder über Immunpräzipitation des z.B. über Polyacrylamidgele gereinigtes sCD44 oder vCD44, oder dadurch, daß Antikörper gegen sCD44 oder vCD44 mit anderen anti-sCD44 oder anti-vCD44 Antikörpern um das Binden an sCD44 oder vCD44 oder Teilen davon konkurrieren.

Von der Erfindung mitumfaßt wird aber auch die Verwendung von Hybridomzelllinien zur Herstellung der in der vorliegenden Erfindung beschriebenen Antikörper enthaltenen Präparationen für den der Erfindung zugrundeliegenden Zwecken.

Auf weitere Einzelheiten betreffend die generelle Verwendung von monoklonalen Antikörpern zur Immunsuppression und bei Autoimmunkrankheiten, von Hybridantikörpern für therapeutische Zwecke und über DNA Rekombination hergestellte Antikörper sei beispielsweise verwiesen auf *Progress in Allergy* Vol. 45, "Monoclonal AntibodyTherapy", 1988 und auf die Arbeit von Seaman, W.E. et al., *Ann. Rev. Med.* 39,:231-241, 1988.

Das CD44 Glykoprotein (Standardform, sCD44) einschließlich seiner Isoformen und Varianten (vCD44, v1 bis v10) sind sowohl für das Tier (z.B. Ratte, Maus) als auch für den Menschen hinsichtlich ihrer Stoffparameter (DNA- und Aminosäuresequenzen, Lokalisation innerhalb des kompletten für CD44 codierenden Gens) und ihrer Herstellung vollständig literaturbeschrieben, sodaß es dem Fachmann anhand dieser Offenbarung ermöglicht wird, beliebige Antikörper bzw. monoklonale Antikörper oder Teile und Derivate davon im Sinne der oben angegebenen Definitionen für jedes auf diesem Proteinen lokalisierte Epitop herzustellen und sie erfindungsgemäß zu benutzen, sodaß ihre Verwendung nicht auf bestimmte spezifische Antikörper oder die sie produzierenden Hybridzelllinien beschränkt ist.

Generell können Präparationen mit derartigen Antikörpern Verwendung finden bei den in der vorliegenden Beschreibung dargestellten Tumorerkrankungen und Immunprozessen bei Tier und Mensch, die die Prävention oder Prophylaxe, oder die therapeutische Behandlung umfassen.

Aufgrund ihrer erfindungsgemäß festgestellten immunsuppressiven Wirkung sind die bezeichneten Antikörper bzw. die sie enthaltenen Präparationen zur Verhinderung und Behandlung von Krankheiten und Zuständen geeignet, die einer vorübergehenden oder dauerhaften Verringerung oder Unterdrückung einer Immunantwort bedürfen.

Insbesondere erstreckt sich ihr Einsatz *in vivo* zur Therapie und Prophylaxe unerwünschter oder überschießenden, für den betreffenden Säugetierorganismus schädlicher Immunantworten durch Verhinderung von LC und DC, an T-Zell-Areale peripherer Lymphknoten anzudocken. Beispielsweise zur Verhinderung oder Behandlung von Autoimmunkrankheiten, wie z.B. Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, Multiple Sklerose, Psoriasis, atopische Dermatitis, oder zur Verhinderung der Abstoßung von transplantierten Geweben oder Organen wie z.B. Niere, Herz, Lunge, Knochenmark, Milz, Cutis oder Cornea, bei unerwünschten Reaktionen während oder nach Transfusionen, von allergischen Erkrankungen, beispielsweise solchen, die den gastro-intestinalen Trakt betreffen und dort endzündlich manifest werden können, oder von endzündlichen, proliferativen und hyperproliferativen Erkrankungen und cutanen Manifestationen immunologisch bedingter Erkrankungen, wie z.B. ekzematöse Dermatitis, Urticaria, Vasculitiden, Sclerodermie.

Abhängig von der Art und Ursache der zu behandelnden Erkrankung oder Störung oder des zu beeinflussenden Zustands in einem tierischen oder menschlichen Körper kann es wünschenswert sein, die Antikörperpräparation systemisch, lokal oder topisch an das oder in das betreffende Gewebe oder Organ zu applizieren. Eine systemische Wirkungsweise ist beispielsweise dann erwünscht, wenn unterschiedliche Organe oder Organsysteme behandlungsbedürftig sind,

wie z.B. bei systemischen Autoimmunkrankheiten oder Allergien oder bei Transplantationen fremder, größerer Organe oder Gewebe oder aber bei schlecht lokalisierbaren Tumoren. Demgegenüber wäre eine lokale Wirkung in Betracht zu ziehen, wenn nur örtliche Manifestationen eines neoplastischen oder immunologischen Geschehens zu beeinflussen sind, wie beispielsweise bei lokalen Tumorgeschehen, kleinflächigen Transplantationen von Cutis, und Cornea oder bei lokalen immunologischen Reaktionen, beispielsweise der Haut, zum Beispiel eine lokale Dermatitis.

Die betreffenden Antikörper können über jede dem Fachmann bekannte enterale oder parenterale Applikationsroute verabreicht werden. Für die systemische Applikation bietet sich beispielsweise die intravenöse, intravaskuläre, intramuskuläre, intraarterielle, intraperitoneale, orale oder intrathecale Route an. Eine eher lokale Verabreichung kann beispielsweise subcutan, intracutan, intrakardial, intralobär, intramedullär, intrapulmonal oder in oder an das zu behandelnde Gewebe (Binde-, Knochen-, Muskel-, Nerven-, Epithel- oder Knochengewebe) erfolgen. Abhängig von der zu erzielenden Dauer und Stärke der immunsuppressiven Wirkung können die Antikörperpräparationen einmal oder mehrmals, auch intermittierend, pro Tag über mehrere Tage, Wochen oder Monate und unterschiedlichen Dosen verabfolgt werden.

Zur Herstellung einer für die genannten Applikationen geeignete Antikörperpräparation können die dem Fachmann bekannten injizierbaren, physiologisch verträglichen Lösungen in steriler Form verwendet werden. Zur Herstellung einer gebrauchsfertigen Lösung zur parenteralen Injektion oder Infusion stehen die bekannten wässrigen isotonischen Lösungen, beispielsweise Saline oder eine entsprechende Plasmaproteinlösung ohne Gammaglobulin, zur Verfügung. Die Präparation kann aber auch in Form eines Lyophilisates bzw. Trockenpräparates vorliegen, welches mit einer der bekannten injizierbaren Lösungen unmittelbar vor dem Gebrauch unter sterilen Bedingungen rekonstituiert werden kann, z.B. als kit-of-parts. Die endgültige Herstellung einer erfindungsgemäß zuverwendenden Antikörperpräparation für die Injektion, Infusion oder Perfusion erfolgt durch Vermischen von nach bekannten Methoden gereinigten Antikörpern gemäß oben angegebener Definitionen mit einem der genannten physiologisch verträglichen Lösungen, welche gegebenenfalls supplementiert sein können mit bekannten Träger- oder Hilfsstoffen (z.B. Serumalbumine, Dextrose, Natriumbisulfit, EDTA).

Die Menge der zu verabreichenden Antikörper hängt ab von der Art und Schwere der zu behandelnden Krankheit oder Störung oder des zu beeinflussenden Zustands und des betreffenden Patienten, gleichgültig ob Tier oder Mensch. Auszugehen ist jedoch von einer zu verwendenden Dosierung von 1 bis 1000 mg, vorzugsweise 5-200 mg des betreffenden Antikörpers pro Dosiseinheit, wie sie auch für andere Antikörper bzw. monoklonale Antikörper üblich ist, wobei zwischen 0.01 bis 20 mg / Tag und 0.1 bis 100 mg / kg Körpergewicht / Tag auch über längere Zeit (Tage, Wochen, Monate) gegeben werden kann, um die gewünschten Effekte zu

erreichen - je nachdem, wie intensiv und über welchen Zeitraum eine prophylaktische oder therapeutische Wirkung erzielt werden soll.

Um zu untersuchen, ob Langerhans-Zellen CD44 exprimieren und ob diese Expression während der LC Aktivierung verändert wird, wurden frisch isolierte LC aus menschlicher Epidermis in eine Kultur übertragen. Dieses Verfahren ahmt LC Aktivierung durch Antigen nach (Schuler, G & Steinman, R.M., *J. Exp. Med.* 161:526-546, 1986). Mit LC angereicherte epidermale Zellsuspensionen wurden entweder unmittelbar nach der Isolierung aus der Haut oder nach 48 und 72 Stunden der epidermalen Gesamtzellkultur einer dreifarbigigen FACS-Analyse ["fluorescence activated cell sorting"] unterworfen. Die Zellen wurden mit monoklonalen Antikörpern (mAbs) gegen HLA-DR, um LC zu identifizieren, und mit mAbs gegen CD44 Epitope gefärbt. Frisch isolierte HLA-DR⁺LC(fLC) exprimierten ein N-terminales Epitop von CD44 (als "pan CD44" bezeichnet) und ein Epitop, welches gemeinsam durch CD44 Exons v7 und v8 gebildet wurde (Fig. 1a). Epitope, die durch Exons v5 und v6 codiert werden, wurden nur schwach exprimiert, wohingegen durch v4, v9 und v10 codierte Epitope nicht detektierbar waren (Fig. 1a). LC, die für 48 und 72 Stunden kultiviert wurden, trugen erhöhte Werte (2-fach) an N-terminalen Epitopen. Die Epitope von v4, v5, v6 und v9 waren ebenfalls abreguliert (Fig. 1a). Demgegenüber ging das CFD44v7/8 während der Kultivierung verloren (Fig. 1a). Ein CD44 v10 Epitop konnte nicht detektiert werden. Daraus ist zu schlußfolgern, daß die LC Aktivierung durch eine erhöhte Synthese von CD44 und durch eine Veränderung von entweder der Zugänglichkeit für das Epitop oder des Epitop-Splicing begleitet wird.

LC gehören zur Familie der dendritischen Zellen (Steinman, R.M., *Annu. Rev. Immunol.* 9:271-296, 1991). Um zu bestimmen, ob DC anderer Herkunft CD44 Epitope exprimieren, welche denen von LC gleichen, wurden DC aus peripherem Blut durch Kultivierung in einem Cytokin-Cocktail präpariert (Sallusto, F. & Lanzavecchia, A., *J. Exp. Med.* 179:1109-1118, 1994). FACS Analyse von CD1a⁺ (DC Marker) Zellen ließ CD44 Epitop Muster erkennen, welche identisch waren zu jenen von kultivierten LC (Fig. 1b). Ein sehr ähnliches Muster der CD44 Expression entstand auch in kultivierten LC aus Haut von BL/6 Mäusen (Fig. 1c).

Um festzustellen, in welchem Stadium LC eine veränderte Expression von CD44 Epitopen während der Kultivierung erfährt, wurde eine Hautexplantat-Kultur (Larsen, C.P. et al., *J. Exp. Med.* 172:1483-1493, 1990) verwendet, in die LC aktiv aus der Epidermis in die Dermis migriert. Vollständige, Vollhaut Stanzbiopsien ("whole thickness punch biopsies") aus Menschenhaut wurden zwischen 0 - 72 Stunden kultiviert. In Gefrierschnitten wurden LC sowohl lichtmikroskopisch mit Lag mAb gegen Birbeck Granula (für menschliche epidermale LC spezifische zytoplasmatische Organellen (Kashihara, M. et al., *J. Invest. Dermatol.* 87:601-607, 1986)) als auch durch Transmissionselektron-Mikroskopie identifiziert. In frisch isolierter Haut waren nahezu alle Lag⁺-Zellen in den suprabasalen Schichten der Epidermis lokalisiert, mit

sehr wenig detektierbaren Lag⁺-Zellen in der Dermis, wohingegen nach 72-stündiger Kultur fast die Hälfte der LC die Epidermis verlassen hatten. Bereits 2 Stunden nach Beginn der Kultur begannen epidermale LC ihre Migration und es wurde nach 12 Stunden festgestellt, daß sie die Basalmembran der epidermo-dermalen Juntura penetriert hatten. Nach 24 Stunden hatten sich die LC in der Dermis in schnurähnlichen Strukturen innerhalb lymphatischer Gefäße ak-

5 kumuliert, was durch ihre charakteristischen, ultrastrukturellen Merkmale eines "single layer" endothelialer Zellen mit herausgetretenen Nuclei elektronenmikroskopisch identifiziert wurde.

Durch immunohistochemische Doppelmarkierung mit mAb Lag (FITC, grün) und CD44 spezi-

10 fischen Antikörpern (Cy3, rot), wurde die Expression von CD44 an LC während der Migration verfolgt. Doppel-Färbung erschien gelb. Keratinozyten färbten sich rot da sie verschiedene CD44 Epitope (CD44v2-v10) tragen (Hofmann, M. et al., *Cancer Res.* 53:1516-1521, 1993; Hudson, D.L. et al., *J. Cell. Science* 108(Pt 5):1959-1970, 1995), aber nicht die Lag Epitope. Die meisten intra-epidermalen LC exprimierten sowohl N-terminale Epitope als auch die durch

15 v7/8 codierten Epitope, wohingegen nur wenige ($\leq 5\%$) davon eine Färbung mit Antikörpern gegen von Exons v5, v6 oder v9 codierten Epitopen zeigten (Fig. 2a, b, c, e, g). Demgegenüber exprimierte die Mehrheit der LC, die in die Dermis migrierten (87.5 - 100%), v5, v6 und v9 Epitope (Fig. 2d, f, h). Somit findet der Wechsel in der Epitop-Präsentation offensichtlich bei der Transition von Epidermis zur Dermis statt. Um diese Beobachtungen zu bestätigen,

20 wurde Spalthaut ("split thickness skin") auf Kulturmedium schwimmend aufgebracht und den LC wurde es ermöglicht, in das Medium zu migrieren. Letztere wurden nach Kultivierung von 48 Stunden gesammelt. Diese LC trugen Epitope des CD44 N-Terminus, v5, v6 und v9, aber nicht v7/8 (Fig. 2 l, m). Somit stimmt der CD44 Phenotyp von LC, die vollständig aus der Haut migrierten, exakt mit denen der *in vitro* aktivierten LC oder DC überein.

Um die LC Migration weiter zu verfolgen, wurden LC in Gefrierschnitten von axillaren Lymphknoten identifiziert, die via lymphatischen Gefäßen zu den regionalen Lymphknoten gewandert waren. In den parakorticalen T-Zell Zonen der Lymphknoten wurden Lag⁺ Zellen gefunden und die Mehrzahl exprimierte Epitope der Exons v4, v5, v6 und v9 (Fig. 2 k) zusätz-

30 lich zum N-Terminus von CD44 (Fig. 2 i), jedoch nicht das v7/8 Epitop. Es kann daraus der Schluß gezogen werden, daß das während der Emigration aus der Epidermis erworbene CD44 Expressionsmuster solange bestehen bleibt, bis LC die Lymphknoten erreicht haben.

Es wurden anti-CD44 Antikörper verwendet, um die funktionelle Bedeutung der CD44 Protei-

35 nexpression während der frühen Stadien der LC Aktivierung, während der Adhesion von LC und DC an Lymphknoten und während der Antigenpräsentation durch LC festzustellen.

Betreffend die Untersuchung der CD44 Funktion während der frühen LC Aktivierung wurden sowohl anti-CD44 N-terminale Antikörper, die einerseits die Hyaluronsäure (HA) Bindung

blockieren (beispielsweise MEM-85, Bennett, K.L. et al., *J. Cell. Biol.* 128:687-698, 1995) und andererseits die HA Bindung nicht blockieren, als auch v5, v6 oder v9 spezifische mAbs zu dem Medium mit der schwimmenden Keratom-Spalthaut ("split thickness keratome skin") hinzugegeben und das Auftreten von LC im Medium über FACS gezählt. LC wurde in der Epidermis durch beide N-terminal spezifischen Antikörper zurückgehalten (60% bis 80% Inhibition), aber nicht durch die Exon spezifischen mAbs (Fig. 3). Andere Antikörper, die den N-Terminus erkennen, zeigten ebenfalls Inhibition, während Antikörper gegen das v7/v8 Epitop nicht inhibitorisch wirkten. Diese Ergebnisse zeigen, daß CD44 in einem sehr frühen Stadium der LC Aktivierung involviert ist. Wenn LC erst aktiviert sind und von Exons v5, v6 und v9 codierte Epitope exprimieren, können Antikörper, welche diese Epitope erkennen, nicht mit der Auswanderung von LC aus der Epidermis interferieren.

Um die Rolle von CD44 während der Adhäsion von aktivierten LC und DC an paracortical T Zell-Areale in Schnitten von Lymphknoten zu bestimmen, wurden zur Blockierung dieser Adhäsion verschiedene anti-CD44 Antikörper verwendet (Fig. 4). MACS[®] (Mikrosphären Aktiviertes Cell Sorting)-gereinigte frische LC, für 48 Stunden kultivierte (und aktivierte) LC und DC aus Blut wurden für einen Lymphknoten-Gefrierschnitt Bindungsassay (Butcher, E. C., et al., *J. Immunol.* 123:1996-2003, 1979) verwendet. LC oder DC wurden über Gegenfärbung mit einem geeigneten Antikörper (beispielsweise CD1a mAb bzw. OKT-6, Ortho, Neckargemünd) identifiziert und die spezifische Adhäsion an Lymphknoten wurde mikroskopisch bestimmt. Frische LC oder immature DC, welche von peripherem Blut gebildet wurden, zeigten nur eine schwache Bindung an Lymphknoten-Gefrierschnitten (Fig. 4a). Kultivierte LC und Cytokin-aktivierte DC adhärten spezifisch und mit erhöhter Effizienz an die paracorticalen T-Zell Areale, aber nicht an die zentralen follikulären B-Zell Areale (Fig. 4b, c). Präinkubation mit den CD44v6 spezifischen VFF18 mAb inhibierte signifikant das Binden von kultivierten LC (bis 66%) und DC (bis 49%) an den T-Zell Zonen (Fig. 4d, e). Ein gegen das N-terminale Epitop im konstanten Teil von CD44 gerichteter Antikörper (zum Beispiel MEM-85, Boehringer Ingelheim Bioproducts, Cat.No. BMS5033Fl.01; Bazil, V. et al., *Folia Biologica* 35(5):289-297, 1989; Spring, F. A. et al., In: *Leucocyte typing V, white cell differentiation antigens*, Schlossman, S.F., Boumsell, L., Gilks, W., Harlan, J. M., Kishimoto, T., Morimoto C., Ritz, J. and Shaw, S. (Ed.), Oxford, New York, Tokyo:Oxford University Press, 1995) inhibierte ebenfalls die Bindung, obwohl weniger effizient. Andere mAbs, die gegen andere v Exon Epitope oder gegen ICAM-1 gerichtet waren, zeigten keinen Effekt. Die mit VFF18 erhaltenen Daten zeigen, daß CD44 die Bindung von LC und DC an einen nicht-identifizierten Partner in der T-Zell Zone der Lymphknoten vermittelt. Diese Wirkung, insbesondere von MEM-85, weist auf eine Bindungsfunktion an Hyaluronsäure hin (die vermutlich nicht auf die T-Zell Zonen beschränkt ist) oder, was wahrscheinlicher ist, an den selben Partner, auf den VFF18 wirkt.

Der entscheidende Test für die LC Funktion stellt ab auf deren Rolle *in vivo* beim Präsentieren eines in der Haut mit T-Zellen zusammengekommenen Antigens. Dazu wurden Mäuse epicutan mit DNFB (Dinitrofluorbenzol) sensitiviert, welches über Stimulation ("challenge") mit dem selben Hapten in Ohrhaut am Tag 6 in einer massiven DTH ("Delayed Type Hypersensitivity") Reaktion resultiert, die über die Ohrschwellung gemessen wurde (Fig. 5). Anti-CD44 mAbs wurden i.p. injiziert an den Tagen -1, 0 und +1 hinsichtlich der Haptenapplikation (um auf Interferenz mit der Sensibilisierungsphase von DTH zu testen, die LC Migration von der Epidermis zu den Lymphknoten und Hapten-Präsentation erfordert (Austyn, J.M., *J. Exp. Med.* 183:1287-1292, 1996)) und an Tagen 5, 6 und 7 (um auf Interferenz mit der Stimulations- ("challenge")Phase zu testen, die Extravasation von Leukozyten erfordert (Camp, R. L. et al., *J. Exp. Med.* 178:497-507, 1993). Die Stimulationsdosis des Haptens wurde an Tag 6 gegeben. Während Antikörper gegen den N-Terminus von CD44 und gegen das v6 Epitop die Extravasations-Phase von DTH inhibierte, inhibierten nur die v4 und v6 spezifischen Antikörper stark die Sensitisation (Fig. 5). Daraus ist zu schlußfolgern, daß CD44 Varianten eine wesentliche Rolle bei der LC Funktion spielt, entweder während der Migration zu den Lymphknoten oder bei der Interaktion mit T-Zellen. Die Inhibition der Extravasationsphase von DTH durch N-terminale CD44 Antikörper ist bekannt (Camp, R. L. et al., 1993, *loc. cit.*). Das Unvermögen von N-terminal-spezifischen anti-CD44 Antikörpern, die LC Aktivierung in der Epidermis *in vivo* zu inhibieren (Fig. 5), es aber *in vitro* können (Fig. 3), ist wahrscheinlich auf die Basalmembran-Barrieren zurückzuführen, die einen wirksamen Eintritt von Antikörpern in die Epidermis nach systemischer Applikation verhindern (Camp, R. L. et al., 1993, *loc. cit.*).

Die Interferenz von anti-CD44v6 Antikörpern mit der LC Funktion erklärt zumindest teilweise ihre Wirkung auf die primäre Immunantwort (Arch, R., et al., *Science* 257:682-685, 1992; Moll, J. et al., *J. Immunol.* 156:2085-2094, 1995). Die gefundene Parallele des LC Verhaltens mit dem lymphatischen Ausbreiten metastasierender Tumorzellen und der Inhibition von beidem durch anti-CD44v6 Antikörpern offenbart eine gleiche Rolle von CD44 in beiden Prozessen. Demzufolge muß angenommen werden, daß die Selektion für die molekulare Funktion und die Nachahmung der molekularen Funktion von CD44 auf LC und DC während der Tumorprogression erfolgt.

Legenden zu den Figuren

Fig. 1: Änderung bei der CD44 Epitop Expression während der *in vitro* Kultivierung von epidermalen LC und Blut DC.

(a) Frisch isolierte human LC und nach 48 und 72 stündiger Kultivierung und (c) Maus BL/6 Haut-LC nach 72 stündiger Kultivierung wurden mit mAbs gegen HLA-DR oder Ia^b, 7-AAD und mAbs gegen CD44 Epitope gefärbt. Die mittlere Fluoreszenzintensität von HLA-DR⁺ Zellen wurde über FACScan bestimmt. Repräsentatives Ergebnis für 6 Versuche mit Zellen verschiedener Spender. Niedrige Expression von CD44v Epitopen auf fLC wurde nicht durch die während des Isolationsverfahrens angewendeten Trypsinisierung verursacht, da identische Trypsinisierung von kultivierten LC nicht signifikant deren CD44v Expression beeinflussten. (b) Korrespondierende Analyse von DC aus humanen peripheren Blut Monozyten generiert, Selektive Bestimmung von CD1a positiven Zellen. Repräsentatives Ergebnis für 4 Versuche mit Zellen verschiedener Spender.

Fig. 2: Von der Epidermis in die Dermis und den Lymphknoten wandernde LC zeigen das selbe CD44 Expressionsmuster wie *in vitro* aktivierte LC/DC.

Gefrierschnitte von für 12 Stunden kultivierte Haut wurden mit FITC-konjugierten mAK Ziege-anti-Maus Lag (erkennt Birbeck Granula, spezifische zytoplasmatische Organellen von LZ, Kashiara, M. et al., *J. Invest. Dermatol.* 87:601-607, 1986) mAbs gefärbt, um LC zu detektieren (grün), und mit Cy3-konjugierten Ziege-anti-Maus CD44 mAbs (rot). Doppelt-positive Zellen erschienen gelb-orange. Der Balken stellt 31 µm dar. Selbe Vergrößerung von A bis K. (a) Färbung mit Lag und anti pan CD44 Antikörper (erkennen Standard Teil des CD44 Moleküls). Lag⁺ Zellen innerhalb der Epidermis (*) und solche, die in die Dermis (**) eingewandert waren, färbten doppelt positiv für Lag und pan CD44 (gelb). Keratinozyten exprimierten pan CD44, aber nicht Lag (rot). Lag⁺ intra-epidermale LC exprimierten ebenfalls das durch Exons v7/v8 (b) gebildete Epitop aber auf sehr niedrigem Niveau die Epitope von CD44 Exon v5 (c), v6 (e) und v9 (g). Lag⁺ Zellen, die in die Dermis eingewandert waren, exprimierten CD44v5 (d), v6 (f) und v9 (h). (i) Pan CD44 Färbung von Lag⁺ Zellen (gelb), welche in den paracorticalen T-Zell Arealen der axillaren Lymphknoten lokalisiert sind und die Haut dränieren. T-Zellen exprimierten ebenfalls CD44 aber nicht Lag (rot). (k) Das Exon v9 Epitop wird in der Mehrzahl exprimiert (gelb) aber nicht auf allen Lag positiven Zellen (Pfeil, grün). (l, m) LC, welche aus Spalthaut ("split-thickness skin") ausgewandert waren, wurden nach HLA-DR Expression selektiert und mit den angegebenen mAbs durch FACS analysiert wie in Fig. 1.

Fig. 3: Antikörper gegen den CD44 N-Terminus verhindern LC Aktivierung und/oder Migration *in vitro*.

Antikörper wurden Spalthautkulturen ("split-thickness skin cultures") hinzugefügt und die Zellen, welche aus der Spalthaut in das Medium ausgewandert waren, wurden durch FACS analysiert. (a) Behandlung mit MEM-85 oder Kontroll mAb. CD1⁺, lebende (Propidiumjodid-negativ) LC sind umkreist. Die Fraktion dieser Zellen über die Gesamtzellzahl wird in der oberen Ecke von jeder Graphik als % angezeigt. (b) Inhibition der LC Emigration durch verschiedene anti-CD44 Antikörper. Die prozentuale Inhibition wurde aus 5 unabhängigen Experimenten berechnet (+/- SD, * statistisch signifikant bei $p < 0.05$, "one way ANOVA", Dunnett's Test, SigmaStat, Jandel Scientific Software).

Fig. 4: Die Bindung von LC oder DC an paracorticale Lymphknoten Areale wird durch Antikörper gegen CD44 inhibiert.

Microbead-gereinigte frische LC (a), für 48 Stunden kultivierte LC (b, d) oder Cytokin-aktivierte DC (c, e) wurden auf gefrorene Schnitte von Lymphknoten (Balken = 31 μ m) plaziert. LC und DC adhärten vorzugsweise an die paracorticalen T-Zell Areale, mit erhöhter Adhäsion über Aktivierung durch die Kultur, aber nicht an die zentralen B Zell Follikel. Die Bindung wurde ebenfalls in Anwesenheit von Antikörpern bestimmt (d,c) (quantifiziert in d und e, * = statistisch signifikant bei $p < 0.05$, "one way ANOVA", Dunnett's Test).

Fig. 5: Antikörper gegen CD44v Epitope inhibieren die Sensibilisierungsphase von Kontakt-Hypersensitivität *in vivo*.

Die Gruppe 2 Mäuse wurden wie angegeben sowohl vor als auch während der Sensibilisierungsphase mit den angegebenen mAbs i.p. behandelt, und die Gruppe 3 Mäuse wurden gleichermaßen vor und während der Stimulationsphase ("challenge phase") behandelt. Mäuse der Gruppe 1 wurden nicht mit mAbs behandelt. * statistisch signifikante Reduktion der Ohrschwellung bei $p < 0.05$ ("one way ANOVA", Dunnett's Test)

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern.

Beispiel 1: Isolierung der Langerhans-Zellen (LC) und der dendritischen Zellen (DC)

Humane epidermale Zellsuspensionen wurden nach der Methode von Simon, J. C., et al., *Exp. Dermatol.* 4:155-161, 1995, durch begrenzte Trypsinisierung von humaner Haut, die bei einer plastischen Operation gewonnen wurde. Murine LC wurden aus der Rumpfhaut weiblicher C57/BL63 Mäuse (Harlan-Olac, Great Britain) gemäß Simon, J. C., et al., *J. Immunol.*

146:485-491, 1991, gewonnen. LC wurden durch Dichtegradientenzentrifugation auf Lymphoprep (Gibco) auf 5 - 20% angereichert. Sowohl frische LC als auch in supplementiertem RPMI (Simon, J.C., et al., *Exp. Dermatol.* 4:155-161, 1995; Simon, J. C., et al., *J. Immunol.* 146:485-491, 1991) für 48 oder 72 Stunden kultivierte LC wurden durch FACS analysiert.
5 Humane DC wurden gemäß Sallusto, F. & Lanzavecchia, A., *J. Exp. Med.* 179:1109-1118, 1994, gebildet und enthielten 80 - 90% CD1a⁺ Zellen.

Beispiel 2: Immunofärbung und Flowzytometrie

10 Zellen wurden gemäß Weiss, J. M., et al. *Eur. J. Immunol.* 25:2858-2862, 1995, mit einem der folgenden Antikörper gefärbt: (a) human spezifisch: N-terminales Epitop = pan CD44, Leu 44 (Klon L178, Maus IgG1, Becton Dickinson); Exon v4, FW 11.10.3 (Maus IgG1, ECACC Nr. 93070776); Exon v5, VFF8 (Maus IgG1, Bender, Wien); Exon v6, VFF18 (Maus IgG1, Bender, Wien, WO 95/33771, DSM ACC2174); Exon v7/v8, VFF17 (Maus IgG2b, Bender, Wien); Exon v9, FW 11.24.7.36 (Maus IgG1, ECACC Nr. 93070775). (b) Mäuse-spezifisch: N-terminales Epitop = pan CD44, IM7.8.1 (Ratten IgG1, ATCC Nr. TIB-235, Lesley, J. et al., *Cell. Immunol.* 112:40-54, 1988; Lesley, J. et al., *Cell Immunol.* 117:378-388, 1988; Trowbridge, I. S. et al., *Immunogenetics* 15:299-312, 1982; Budd, R. C. et al., *J. Immunol.* 138:3120-3129, 1987); ein gegen Exon v4 gerichteter monoklonaler Antikörper; ein gegen Exon v6 gerichteter monoklonaler Antikörper; Isotyp Kontrolle, IB7 (Ratten IgG1; Dianova, Hamburg). Sekundäre Antikörper: FITC-markierte Schaf-anti-Maus (Fab)₂ und Schaf-anti-Maus (Fab)₂ (Dianova, Hamburg). Der Behandlung mit dem sekundären Antikörper folgte eine 10minütige Inkubation in 2% normalen Mäuse oder Ratten Serum und daraufhin eine Inkubation mit PE-(Phykoerythrin-)markiertem HLA-DR spezifischen Antikörper (L234, Mäuse IgG1, Becton Dickinson) oder Ia^b (Mäuse IgG2b, Pharmingen, Hamburg) oder entsprechende nicht-reaktive PE-markierte Kontroll-Antikörper (Dianova). Humane DC wurden durch FITC-konjugierte mAb gegen CD1a (Okt-6, Mäuse IgG1, Ortho, Neckargemünd) identifiziert. 7-Aminoactinomycin D (7-ADD)(2.5mg/ml, Sigma) wurde hinzugegeben, um tote Zellen auszuschließen. Zell Quest Software (Becton Dickinson) wurde für die Analyse von jeweils 10⁴ HLA-DR⁺, CD1a⁺ oder Ia^b lebenden Zellen angewandt.

Beispiel 3: Vollhaut Organkultur

35 4 mm dicke Haut-Stanzbiopsien, die Dermis und Epidermis enthielten, wurden in 25 mm Gewebekultur-Einsätze mit einer 0.02 mm Anopore Membran (Nunc) in 6-Loch Gewebekulturplatten, welche mit supplementiertem DMEM/HAMS-F12 (Gibco) bis zur epidermo-dermalen Grenze aufgefüllt wurden, inkubiert. Die Kultivierungen wurden zu den angegebenen Zeit-

punkten beendet und Proben in N₂ schock-gefroren. Gewebeschnitte (5 mm) wurden präpariert (Cryocut 1800, Leica) und nach der Methode von Negoescu, A. et al., *J. Histochem. Cytochem.* 42:433-437, 1994, mit einer Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung angefärbt. Als erstes wurden Gefrierschnitte mit Lag mAB für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 4°C über Nacht mit FITC-konjugierten Ziege-anti-Maus monovalenten Antikörpern (Fab) (Dianova). Zum zweiten wurden Gefrierschnitte mit mAbs gegen CD44 Epitope für 30 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend mit Cy3-konjugierten Ziege-anti-Maus Antikörpern (Fab) inkubiert (4°C, 4 Stunden). Kreuzinterferenz der verschiedenen Färbeschritte wurde durch entsprechende Kontrollen ausgeschlossen. Für die quantitative Analyse von gesamten und CD44⁺/Lag⁺ doppelt-positiven LC wurden 5 stark vergrößerte Felder mikroskopisch ausgezählt und die LC-Zahl/mm² bestimmt.

Beispiel 4: Spalthaut Organkultur

2 x 2 cm Spalthaut, welche Epidermis plus papillare Dermis enthielt, wurde über Dermatome (Aesculap, Tuttlingen) gemäß Pope, M. et al., *J. Invest. Dermatol.* 104:11-17, 1995, präpariert und auf supplementiertes RPMI in 6-Loch Platten (Greiner, Nürtingen) gegeben. Nach 3 Tagen wurden die Zellen, die in das Kulturmedium gewandert waren, gesammelt. Die Keratinozyten wurden durch Dermatom Manipulation in eine Suspension gezwungen. Die Anfärbung mit FITC-konjugierten mAbs gegen CD1a und FACS wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Alle aus einem Loch erhaltenen Zellen ($5 - 6 \times 10^5$) wurden analysiert. Der Prozentsatz an CD1a⁺ Zellen wurde anhand der Cell Quest[®] Software (Becton Dickinson, Heidelberg) berechnet. Der Prozentsatz an emigrierenden LC aus unbehandelten Proben wurde als 0% Inhibition definiert.

Beispiel 5: Lymphknoten Adhäsions Assay

Nach Simon, J. C. et al., *Exp. Dermatol.* 4:155-161, 1995, mit Antikörpern gegen HLA-DR oder CD1a angereicherte LC oder DC MACS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) wurden auf ihre Bindung an Lymphknoten-Gefrierschnitten getestet (Pope, M. et al., *J. Invest. Dermatol.* 104:11-17, 1995). Frische, auf Objektträger aufgelegte Gefrierschnitte (10 mm) von humanen axillaren Lymphknoten wurden mit RPMI, mit 1% Rinderserumalbumin (BSA), bei 7°C für 1 Stunde geblockt. LC oder DC wurden in HBSS (Gibco)/1% BSA suspendiert (2×10^6 Zellen/ml) und die Gefrierschnitte bei Raumtemperatur für 40 Minuten aufgelegt. Die Objektträger wurden mit HBSS gespült und in Aceton bei 4°C für 10 Minuten fixiert. Für die Blockierung der Antikörper wurden LC oder DC mit mAbs (jeweils 20 mg/ml für 30 Minuten bei 4°C) präinkubiert, welche gegen den N-Terminus von CD44 (SFF-2, MEM-85) gerichtet

waren, mit v Exon spezifischen Antikörpern (v5, VFF-8; v6, VFF-18; v9, FW 11.24.7.36), mit ICAM-1 mAb 84H10 (Immunotech Corp., Boston, USA; Makgoba, M. W. et al., *Nature* 331:86-88, 1988) oder mit Kontroll IgG1. Die Objektträger wurden anschließend gemäß Simon, J. V. C. et al., *Europ. J. Cancer* 32A:1394-1400, 1996, mit anti-CD1a mAb gefärbt. Die Codierung und Evaluierung erfolgte durch zwei unabhängige Untersucher. Die Hintergrund-Bindung von kultivierten LC/DC war ungefähr 1.5 Zellen/mm², die Positiv-Bindung war 30 Zellen/mm². Die Daten wurden als % Bindung im Vergleich zu Proben ohne Antikörper aufgetragen. Die Standartabweichung wurde anhand von drei Objektträgern, jeder mit 9 Zufallsfeldern pro Objektträger, durch Verwendung eines optischen Gitternetzes (Vergrößerung 10 x), berechnet.

Beispiel 6: Kontakt Hypersensitivität

6 Wochen alte weiblichen C57/BL63 Mäusen (Harlan-Olac, Great Britain) wurden auf die abdominale Haut 20 µl 0.5% 2,4-Dinitrofluorbenzol (DNFB; Sigma, Deisenhofen) in Aceton am Tag 0 und 1 gemäß Simon, J. C. et al., *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 10:206-211, 1994, aufgetragen. Am Tag 6 wurde den Mäusen 10 µl 0.2% DNFB beidseitig auf das rechte Ohr aufgetragen. Die Ohrdicke wurde mit einem Ingenieur Mikrometer (Mitutoyo Corp., Takatsu-Ku, Kawasaki-Shi, 213 Kanagawa-Ken, Japan) vor und zum Zeitpunkt 24 Stunden nach der Stimulation gemessen (Simon, J. C. et al., *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 10:206-211, 1994). Die Gruppe 1 Mäuse wurden entweder nur stimuliert oder sensibilisiert und stimuliert in Abwesenheit von mAbs. Die Injektion der mAbs (i.p.) wurde wie folgt durchgeführt: Gruppe 2 Mäuse erhielten 300 mg am Tag 1, jeweils 100 mg an den Tagen 0 und 1. Gruppe 3 Mäuse erhielten 300 mg am Tag 5 und jeweils 100 mg an den Tagen 6 und 7. Jeder Balken (Fig. 5) repräsentiert die von 8 Tieren gepoolten mittleren Werte der Ohrschwellungen.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

(A) NAME: Boehringer Ingelheim International GmbH

(B) STRASSE: Rheinstrasse

(C) ORT: Ingelheim

(E) LAND: Deutschland

(F) POSTLEITZAHL: 55216

(G) TELEFON: ++49-(0)6132-77-2770

(H) TELEFAX: ++49-(0)6132-77-4377

(A) NAME: Forschungszentrum Karlsruhe GmbH

(B) STRASSE: Weberstr. 5

(C) ORT: Karlsruhe

(E) LAND: Deutschland

(F) POSTLEITZAHL: 76133

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Verwendung von anti-CD44 Antikörpern enthaltenden Praeparationen zur Behandlung bestimmter Tumore und zur Unterdrueckung von Immunreaktionen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 4

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

(A) DATENTRÄGER: Floppy disk

(B) COMPUTER: IBM PC compatible

(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 39 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid.

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Ile Ser Thr Thr Pro Arg Ala Phe Asp His Thr Lys Gln Asn Gln Asp
1 5 10 15

Trp Thr Gln Trp Asn Pro Ser His Ser Asn Pro Glu Val Leu Leu Leu
20 25 30

Gln Thr Thr Thr Arg Met Thr
35

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 39 Aminosäuren

10

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

15

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Asp Val Asp Arg Asn Gly Thr Thr Ala Tyr Glu Gly Asn Trp Asn Pro
1 5 10 15

20

Glu Ala His Pro Pro Leu Ile His His Glu His His Glu Glu Glu Glu
20 25 30

25

Thr Pro His Ser Thr Ser Thr
35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

30

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 42 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

35

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

Gln Ala Thr Pro Ser Ser Thr Thr Glu Glu Thr Ala Thr Gln Lys Glu
1 5 10 15

Gln Trp Phe Gly Asn Arg Trp His Glu Gly Tyr Arg Gln Thr Pro Arg
20 25 30

45

Glu Asp Ser His Ser Thr Thr Gly Thr Ala
35 40

50

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 30 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

5

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

10 Gln Gln Ser Asn Ser Gln Ser Phe Ser Thr Ser His Glu Gly Leu Glu
1 5 10 15
Glu Asp Lys Asp His Pro Thr Thr Ser Thr Leu Thr Ser Ser
20 25 30


BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Boehringer Ingelheim
International GmbH
Postfach 200

55216 Ingelheim am Rhein

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen: SFF-2	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM ACC2305
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
<p>Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde</p> <p>(X) eine wissenschaftliche Beschreibung () eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung</p> <p>eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).</p>	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 1997-04-16 (Datum der Ersthinterlegung) ¹ eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 1997-04-25

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.


**BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN**

INTERNATIONALES FORMBLATT

Boehringer Ingelheim
International GmbH
Postfach 200

55216 Ingelheim am Rhein

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER		II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Name: Boehringer Ingelheim International GmbH Anschrift: Postfach 200 55216 Ingelheim am Rhein		Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM ACC2305 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung: 1997-04-16	
III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG			
Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 1997-04-16 ¹ geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus (X) ¹ lebensfähig () ¹ nicht mehr lebensfähig			
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST ¹			
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE			
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig		Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 1997-04-25	

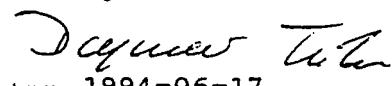
Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.
In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.
Zutreffendes ankreuzen.
Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Boehringer Ingelheim Int. GmbH

Postfach 200
55216 Ingelheim am RheinLEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER	II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS
Name: Boehringer Ingelheim Int. GmbH Anschrift: Postfach 200 55216 Ingelheim am Rhein	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM ACC2174 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung ¹ : 1994-06-07
III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG	
Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 1994-06-07 ² geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus (X) ³ lebensfähig () ³ nicht mehr lebensfähig	
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST ⁴	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSM-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 1994-06-17

- ¹ Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.
² In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.
³ Zutreffendes ankreuzen.
⁴ Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

Patentansprüche

1. Verwendung von anti-sCD44 und/oder anti-vCD44 Antikörpern zur Herstellung einer Prä-
5 paration für die prophylaktische und therapeutische Behandlung von malignen Erkrankungen, die mit einer Entartung, Aktivierung oder massiven Vermehrung von Langerhans Zellen (LC) und/oder dendritischen Zellen (DC) assoziiert sind.
2. Verwendung von anti-sCD44 und/oder anti-vCD44 Antikörpern zur Herstellung einer Prä-
10 paration für die prophylaktische und therapeutische Behandlung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die malignen Erkrankungen Langerhans-Zell-Histiozytosen, Histiozytose X, Abt-Letterer-Siewe-Syndrom oder eosinophiles Granulom sind.
3. Verwendung von anti-sCD44 Antikörpern zur Herstellung einer Präparation für die pro-
15 phylaktische und therapeutische Behandlung gemäß Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper N-terminale Epitope von sCD44, oder Teilen davon, erkennen.
4. Verwendung von anti-vCD44 Antikörpern zur Herstellung einer Präparation für die pro-
20 phylaktische und therapeutische Behandlung gemäß Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper von durch variante Exons von vCD44 kodierte Epitope, oder Teilen davon, erkennen
5. Verwendung von anti-vCD44 Antikörpern zur Herstellung einer Präparation für die pro-
25 phylaktische und therapeutische Behandlung gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper von durch die varianten Exons v4, v5, v6 und/oder v9 kodierten Epitope, oder Teilen davon, erkennen.
6. Verwendung von anti-vCD44 Antikörpern zur Herstellung einer Präparation für die pro-
30 phylaktische und therapeutische Behandlung gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper mit den folgenden Aminosäuresequenzen oder Teilen davon zu reagieren vermögen:

ISTTPRAFDHTKQNQDWTQWNPSHSNPEVLLLQTTTRMT
DVDRNGTTAYEGNWNPEAHPPLIHHEHHEEEETPHSTST
35 QATPSSTTEETATQKEQWFGNRWHEGYRQTPREDSHSTTGTA
QQSNSQSFSSTHEGLEEDKDHPPTTSTLTSS.

7. Verwendung von anti-vCD44 Antikörpern zur Herstellung einer Präparation für die pro-
phylaktische und therapeutische Behandlung gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet,

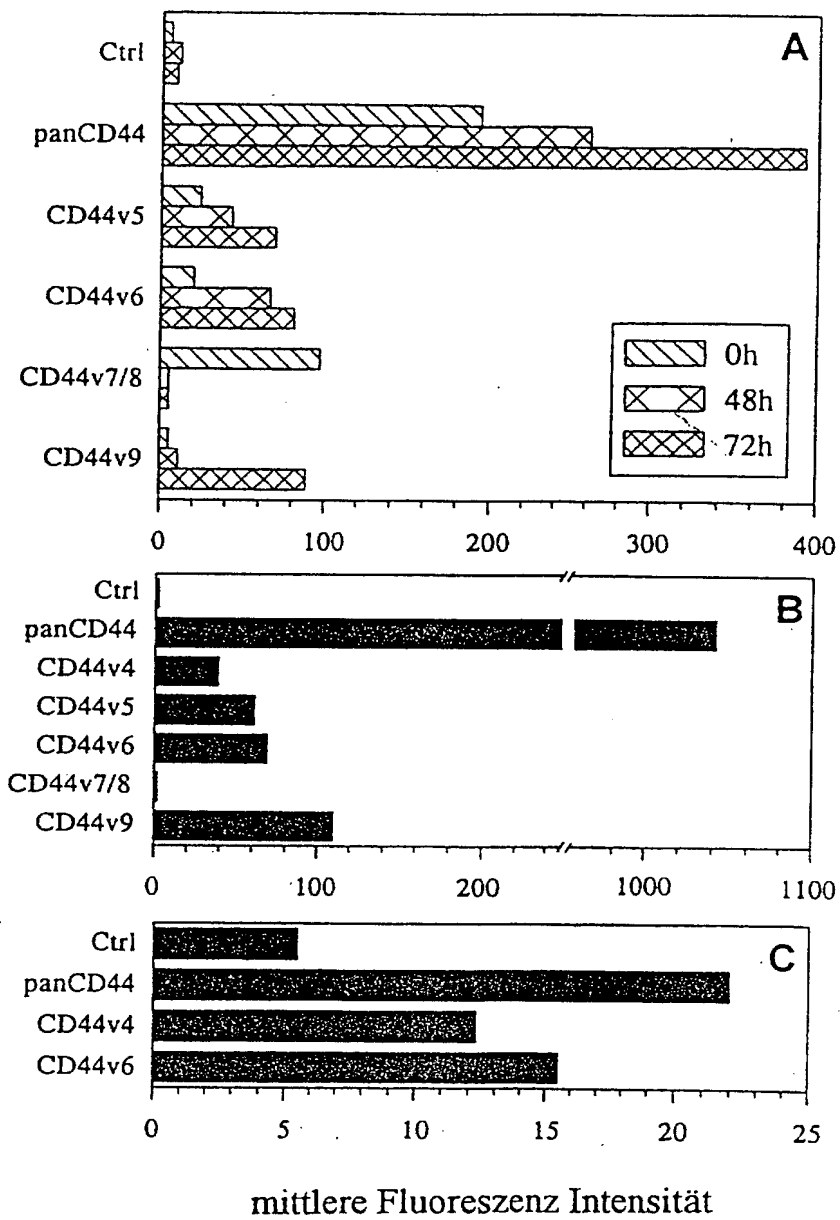
daß der Antikörper aus dem gegen durch v6 kodierte Epitop, oder Teilen davon, gerichteten Antikörper VFF-18 und solchen Antikörpern, die mit dem von VFF-18 erkannten Epitop oder Teilen davon zu reagieren vermögen, besteht.

- 5 8. Verwendung von anti-sCD44 Antikörpern zur Herstellung einer Präparation zur prophylaktischen und therapeutischen Behandlung von Erkrankungen und Zuständen eines Säugetierorganismus, denen eine immunregulatorische Störung oder eine unerwünschte oder überschießende Immunreaktion zugrundeliegt.
- 10 9. Verwendung von anti-sCD44 Antikörpern zur Herstellung einer Präparation gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die immunregulatorische Störung oder die unerwünschte oder überschießende Immunreaktion allergische Erkrankungen, Allergien vom verzögerten Typ, Abstoßungen von Haut- oder Organtransplantaten, Autoimmunerkrankungen, Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, Multiple Sklerose, Psoriasis oder
15 atopische Dermatitis sind.
10. Verwendung von anti-sCD44 Antikörpern zur Herstellung einer Präparation für die prophylaktische und therapeutische Behandlung gemäß Ansprüchen 8 und 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper N-terminale Epitope von sCD44, oder Teilen davon, erkennen.
20
11. Verwendung von anti-sCD44 und/oder anti-vCD44 Antikörpern zur Herstellung einer Präparation für die prophylaktische und therapeutische Behandlung gemäß Ansprüchen 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper monoklonale Antikörper oder Fragmente oder Derivate davon sind.
25
12. Verwendung des gegen das durch v6 kodierte Epitop, oder Teilen davon, gerichteten Antikörpers VFF-18 und solchen Antikörpern, die mit den von VFF-18 erkannten Epitop oder Teilen davon zu reagieren vermögen, zur prophylaktischen und therapeutischen Behandlung von Erkrankungen und Zuständen eines Säugetierorganismus gemäß einem der Ansprüche 8 und 9.
30
13. Verfahren zur Herstellung von dendritischen Zellen, dadurch gekennzeichnet, daß isolierte Monocyten in einem Kulturmedium, bestehend aus RPMI 1640, fetales Kälberserum, Penicillin/Streptomycin, einem aus einer N-substituierten Aminosulfonsäure bestehenden Puffer, nicht-essentielle Aminosäuren, L-Glutamin, GM-CSF und einem Interleukin, für einige
35 Tage kultiviert und anschließend isoliert werden.

14. Verfahren zur Herstellung von dendritischen Zellen gemäß Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet., daß die isolierten Monocyten in einem Kulturmedium, bestehend aus RPMI 1640, 10% FCS, 45µ Penicillin/Streptomycin, 25 mM Hepes, 1 mM nicht-essentielle Aminosäuren, 2 mM L-Glutamin, 50 ng/ml human GM-CSF und 1000 U/ml IL-4 für 8 Tage kultiviert und anschließend isoliert werden.

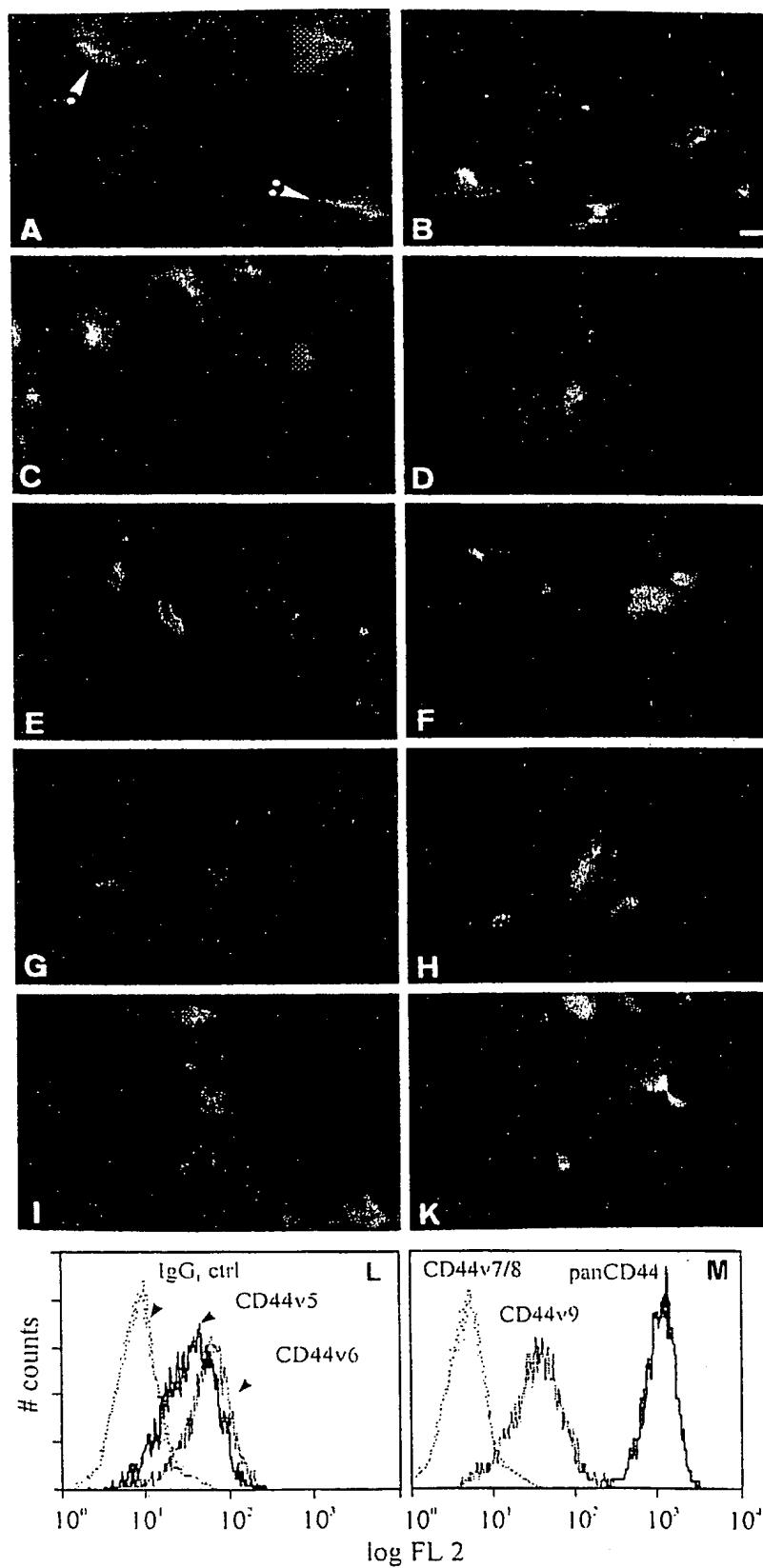
5

1/5

*Fig. 1*

ERSATZBLATT (REGEL 26)

2/5

*Fig. 2*

ERSATZBLATT (REGEL 26)

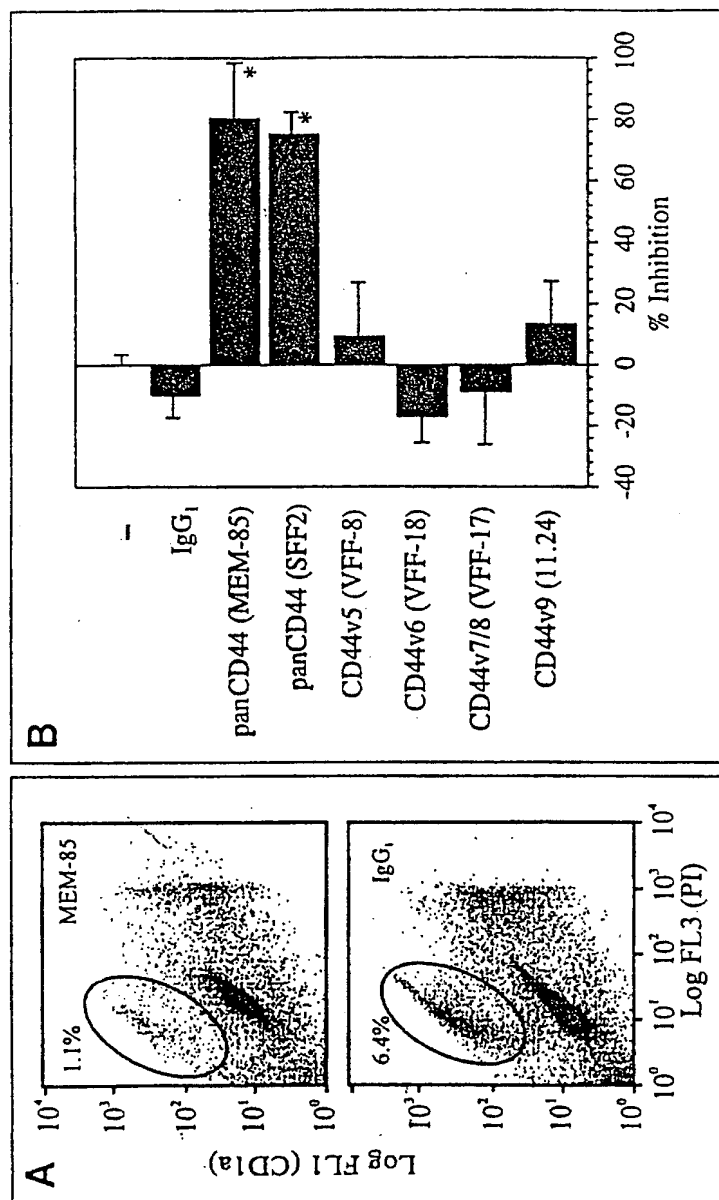
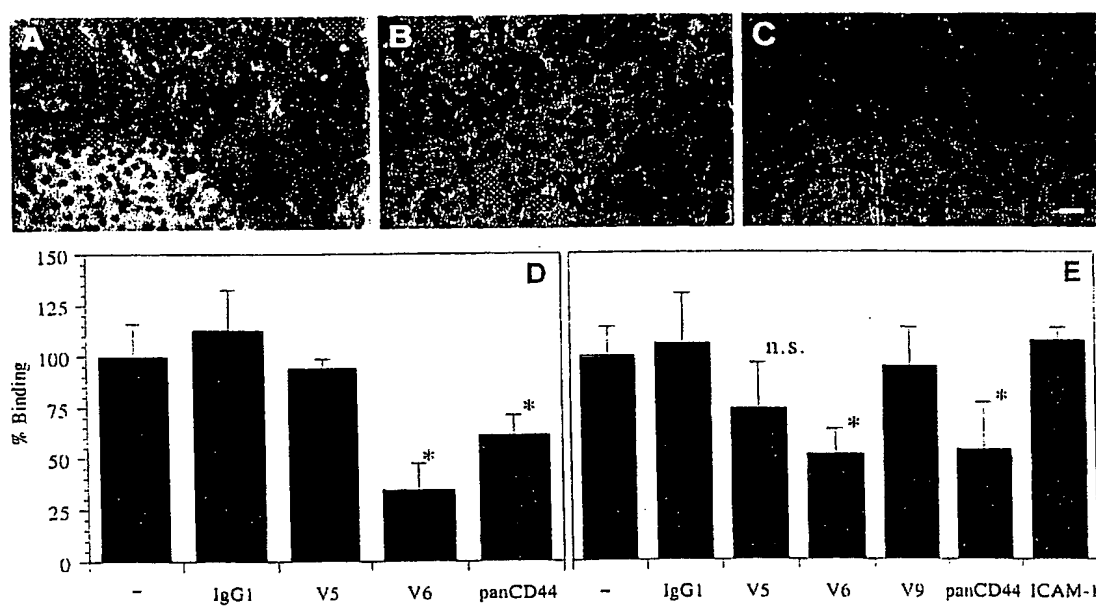


Fig. 3

4/5

*Fig. 4*

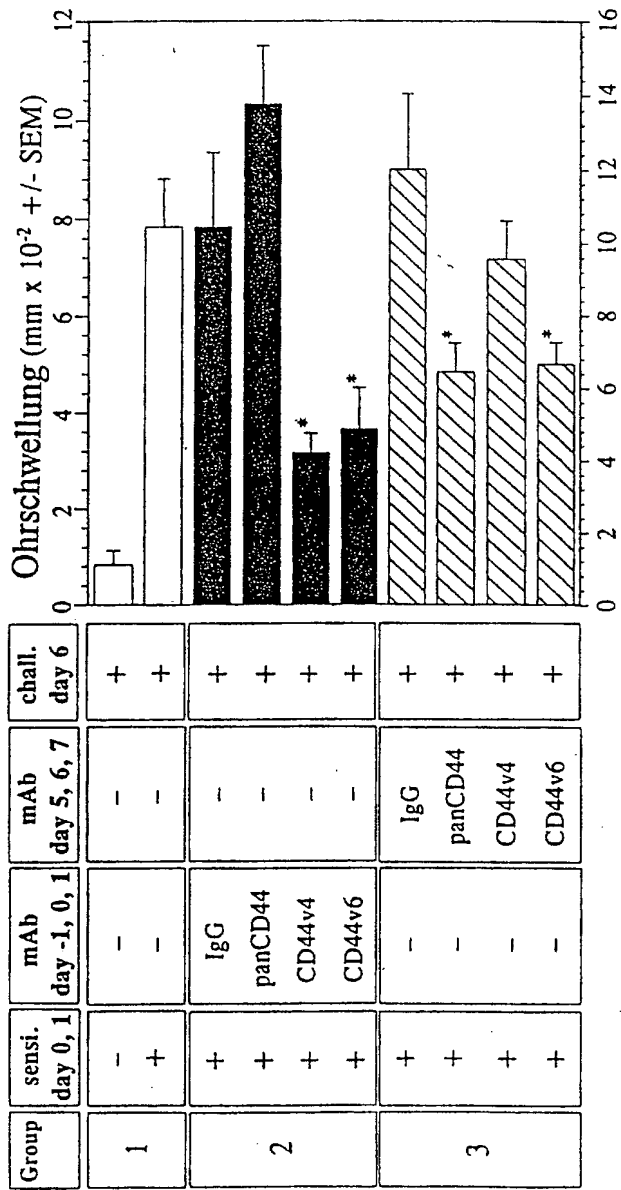


Fig. 5

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : A61K 39/395, C12N 5/06, 5/08	A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/39034 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 11. September 1998 (11.09.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/01089 (22) Internationales Anmeldedatum: 26. Februar 1998 (26.02.98) (30) Prioritätsdaten: 197 08 713.2 4. März 1997 (04.03.97) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH [DE/DE]; D-55216 Ingelheim (DE). FORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE GMBH [DE/DE]; Weberstrasse 5, D-76133 Karlsruhe (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HERRLICH, Peter [DE/DE]; Im Vogelsang 8, D-76229 Karlsruhe (DE). PONTA, Helmut [DE/DE]; Schillerstrasse 76, D-76356 Weingarten (DE). SIMON, Jan [DE/DE]; Becherwaldstrasse 27a, D-79249 Merzhausen (DE). WEISS, Johannes [DE/DE]; Schillerstrasse 5a, D-79183 Waldkirch (DE). (74) Anwalt: LAUDIEN, Dieter; Boehringer Ingelheim GmbH, A Patente, Postfach 200, D-55216 Ingelheim (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, MX, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i> (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 17. Dezember 1998 (17.12.98)
(54) Title: USE OF PREPARATIONS CONTAINING ANTI-CD44 ANTIBODIES IN THE TREATMENT OF CERTAIN TUMOURS AND THE SUPPRESSION OF IMMUNE REACTIONS (54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON ANTI-CD44 ANTIKÖRPER ENTHALTENDEN PRÄPARATIONEN ZUR BEHANDLUNG BESTIMMTER TUMORE UND ZUR UNTERDRÜCKUNG VON IMMUNREAKTIONEN (57) Abstract The present invention relates to the use of anti-CD44 antibodies from the constant portion (sDC44) and variable portion of CD44 (VCD44) in the treatment of certain tumours and other diseases which are associated with degeneracy and activation of Langerhans cells (LC) and dendritic cells (DC) in the body of a mammal including human beings, and in the treatment of undesirable immune reactions. The invention also relates to an <i>ex vivo</i> culture method for the production of dendritic cells. (57) Zusammenfassung Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von anti-CD44 Antikörpern von sowohl des konstanten (sCD44) als auch des variablen Teils von CD44 (vCD44) für die Behandlung bestimmter Tumore und anderen Erkrankungen, die mit einer Entartung und Aktivierung von Langerhans-Zellen (LC) und dendritischen Zellen (DC) innerhalb eines Säugetierkörpers einschließlich des Menschen assoziiert sind, und zur Behandlung unerwünschter Immunreaktionen. Ein weiter Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft ein <i>ex vivo</i> Kulturverfahren zur Herstellung von dendritischen Zellen.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland		
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/01089

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A61K39/395 C12N5/06 C12N5/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	F. BRENNAN ET AL.: "Anti-CD44 antibody prevents and ameliorates chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis (CREAE) by inhibiting leukocyte migration to the CNS." ARTHRITIS & RHEUMATISM, vol. 39, no. 9 suppl., 1996, page S121 XP002081982 New York, NY, USA see abstract 625 --- -/--	8-11



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 October 1998

Date of mailing of the international search report

05/11/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Nooij, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In tional Application No
PCT/EP 98/01089

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	B. SANDMAIER ET AL.: "An anti-CD44 antibody does not enhance engraftment of DLA-identical marrow after low-dose total body irradiation." TRANSPLANT IMMUNOLOGY, vol. 4, no. 4, December 1996, pages 271-274, XP002081983 Sevenoaks see abstract ---	8-11
X	WO 94 09811 A (DUKE UNIVERSITY) 11 May 1994 see examples see claims ---	8-11
X	WO 95 33771 A (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL, GMBH) 14 December 1995 cited in the application see page 3, line 31 - page 4, line 25 see examples see claims ---	12
X	K-H. HEIDER ET AL.: "Splice variants of the cell surface glycoprotein CD44 associated with metastatic tumour cells are expressed in normal tissues of humans and cynomolgus monkeys." EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, vol. 31A, no. 13/14, December 1995, pages 2385-2391, XP000644485 Oxford, GB see abstract see Discussion ---	12
X	H. HAEGEL-KRONENBERGER ET AL.: "Regulation of CD44 isoform expression and CD44-mediated signalling in human dendritic cells." ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY, vol. 417, 1997, pages 83-90, XP002081984 New York, NY, USA see the whole document ---	13, 14
Y	---	1-7
Y	EP 0 538 754 A (KERNFORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE ET AL.) 28 April 1994 cited in the application see the whole document -----	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 98/01089

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Observation: Although claim 12 relates to a method of treatment for the human/animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See Additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

The International Searching Authority has found that this international application contains several (groups of) inventions, as follows:

1. Claims: 1-7

Use of anti-sCD44 and/or anti-vCD44 antibodies to produce a preparation for prophylactic and therapeutic treatment of malignant diseases which are associated with degeneration, activation or a massive increase in Langerhans cells and/or dendritic cells

2. Claims: 8-12

Use of anti-sCD44 and/or anti-vCD44 antibodies to produce a preparation for prophylactic and therapeutic treatment of diseases and conditions of a mammal organism which is afflicted by an immunoregulatory disorder or by an undesired or an excessive immunereaction.

3. Claims: 13,14

Method for producing dendritic cells from a culture of isolated monocytes.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/01089

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9409811	A	11-05-1994	AU 5543594	A	24-05-1994
WO 9533771	A	14-12-1995	DE 4431297	A	07-03-1996
			AU 2737095	A	04-01-1996
			BG 101024	A	30-09-1997
			BR 9507964	A	02-09-1997
			CA 2192370	A	14-12-1995
			CN 1152925	A	25-06-1997
			CZ 9603591	A	12-11-1997
			EP 0765343	A	02-04-1997
			FI 964845	A	04-12-1996
			HU 76260	A	28-07-1997
			JP 10501797	T	17-02-1998
			NO 965239	A	06-12-1996
			PL 317536	A	14-04-1997
			SK 154896	A	06-08-1997
			ZA 9504678	A	08-12-1995
EP 538754	A	28-04-1993	DE 4134982	A	29-04-1993
			AT 162079	T	15-01-1998
			AU 659687	B	25-05-1995
			AU 2724492	A	29-04-1993
			CA 2081150	A	24-04-1993
			DE 59209129	D	19-02-1998
			DK 538754	T	30-03-1998
			ES 2111031	T	01-03-1998
			JP 5310596	A	22-11-1993
			NZ 244851	A	27-07-1997
			ZA 9208162	A	05-05-1993

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 6 A61K39/395 C12N5/06 C12N5/08

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>F. BRENNAN ET AL.: "Anti-CD44 antibody prevents and ameliorates chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis (CREAE) by inhibiting leukocyte migration to the CNS." ARTHRITIS & RHEUMATISM, Bd. 39, Nr. 9 suppl., 1996, Seite S121 XP002081982 New York, NY, USA siehe Zusammenfassung 625</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	8-11

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

23. Oktober 1998

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

05/11/1998

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Nooij, F

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	B. SANDMAIER ET AL.: "An anti-CD44 antibody does not enhance engraftment of DLA-identical marrow after low-dose total body irradiation." TRANSPLANT IMMUNOLOGY, Bd. 4, Nr. 4, Dezember 1996, Seiten 271-274, XP002081983 Sevenoaks siehe Zusammenfassung ---	8-11
X	WO 94 09811 A (DUKE UNIVERSITY) 11. Mai 1994 siehe Beispiele siehe Ansprüche ---	8-11
X	WO 95 33771 A (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL, GMBH) 14. Dezember 1995 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 3, Zeile 31 - Seite 4, Zeile 25 siehe Beispiele siehe Ansprüche ---	12
X	K-H. HEIDER ET AL.: "Splice variants of the cell surface glycoprotein CD44 associated with metastatic tumour cells are expressed in normal tissues of humans and cynomolgus monkeys." EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, Bd. 31A, Nr. 13/14, Dezember 1995, Seiten 2385-2391, XP000644485 Oxford, GB siehe Zusammenfassung siehe Discussion ---	12
X	H. HAEGEL-KRONENBERGER ET AL.: "Regulation of CD44 isoform expression and CD44-mediated signalling in human dendritic cells." ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY, Bd. 417, 1997, Seiten 83-90, XP002081984 New York, NY, USA siehe das ganze Dokument	13,14
Y	---	1-7
Y	EP 0 538 754 A (KERNFORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE ET AL.) 28. April 1994 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument -----	1-7

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Bemerkung: Obwohl der Anspruch 12 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

sich Zusatzblatt

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☒ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefodert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-7

Verwendung von anti-sCD44 und/oder anti-vCD44 Antikörpern zur Herstellung einer Präparation für die prophylaktische und therapeutische Behandlung von malignen Erkrankungen die mit einer Entartung, Aktivierung oder massiven Vermehrung von Langerhans Zellen und/oder dendritischen Zellen assoziiert sind.

2. Ansprüche: 8-12

Verwendung von anti-sCD44 oder anti-CD44v6 Antikörpern zur Herstellung einer Präparation zur prophylaktischen und therapeutischen Behandlung von Erkrankungen und Zuständen eines Säugetierorganismus den eine immunregulatorische Störung oder eine unerwünschte oder überschüssige Immunreaktion zugrundeliegt.

3. Ansprüche: 13, 14

Verfahren zur Herstellung von dendritischen Zellen aus einer Kultur von isolierten Monozyten.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/01089

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9409811	A	11-05-1994	AU	5543594 A	24-05-1994
WO 9533771	A	14-12-1995	DE	4431297 A	07-03-1996
			AU	2737095 A	04-01-1996
			BG	101024 A	30-09-1997
			BR	9507964 A	02-09-1997
			CA	2192370 A	14-12-1995
			CN	1152925 A	25-06-1997
			CZ	9603591 A	12-11-1997
			EP	0765343 A	02-04-1997
			FI	964845 A	04-12-1996
			HU	76260 A	28-07-1997
			JP	10501797 T	17-02-1998
			NO	965239 A	06-12-1996
			PL	317536 A	14-04-1997
			SK	154896 A	06-08-1997
			ZA	9504678 A	08-12-1995
EP 538754	A	28-04-1993	DE	4134982 A	29-04-1993
			AT	162079 T	15-01-1998
			AU	659687 B	25-05-1995
			AU	2724492 A	29-04-1993
			CA	2081150 A	24-04-1993
			DE	59209129 D	19-02-1998
			DK	538754 T	30-03-1998
			ES	2111031 T	01-03-1998
			JP	5310596 A	22-11-1993
			NZ	244851 A	27-07-1997
			ZA	9208162 A	05-05-1993